

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Therapie des präklinischen CNGB1-defizienten Mausmodells der  
Retinitis pigmentosa mittels rekombinanter AAV-Vektoren**

Susanne Friederike Koch  
aus Bamberg  
2013

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den

---

Susanne Koch

Dissertation eingereicht am 08.04.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

2. Gutachter: PD Dr. Stylianos Michalakis

Mündliche Prüfung am 14.05.2013

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b>  | <b>I</b>  |
| <b>I EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1 RETINITIS PIGMENTOSA   | 1         |
| 2 CNGB1-DEFIZIENTE MÄUSE ALS MODELL FÜR RETINITIS PIGMENTOSA               | 6         |
| 3 GENSATZTHERAPIE  | 11        |
| 4 ADENO-ASSOZIIERTE VIREN  | 12        |
| <b>II ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>   | <b>17</b> |
| <b>III MATERIAL UND METHODEN</b>   | <b>18</b> |
| 1 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER   | 18        |
| 2 VERWENDETE MAUSLINIE   | 18        |
| 3 GENOTYPISIERUNG  | 19        |
| 3.1 Isolierung genomischer DNA für die Genotypisierung                     | 19        |
| 3.2 Polymerasekettenreaktion für die Genotypisierung                       | 19        |
| 3.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente                       | 20        |
| 4 KLONIERUNG DES PAAV2.1-RHO-MCNGB1A-SV40-VEKTORS                          | 21        |
| 4.1 Polymerasekettenreaktion für die Klonierung                            | 21        |
| 4.2 Aufreinigung der DNA-Fragmente   | 22        |
| 4.3 Plasmid pAAV2.1-mcs  | 23        |
| 4.4 Restriktion  | 23        |
| 4.5 Ligation   | 23        |
| 4.6 Transformation   | 24        |
| 4.7 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse                   | 24        |
| 5 HERSTELLUNG DES RHO-MCNGB1A RAAV-VEKTORS                                 | 26        |
| 5.1 Transfektion   | 26        |
| 5.2 Ernte  | 28        |
| 5.3 Aufreinigung der rAAV-Vektoren über einen Iodixanol-Gradienten         | 29        |
| 5.4 Aufreinigung der rAAV-Vektoren mittels Anionenaustauschchromatographie | 30        |
| 5.5 Konzentrierung und Umsalzung der rAAV-Vektoren                         | 31        |
| 5.6 rAAV-Titerbestimmung mittels quantitativer real-time PCR               | 32        |
| 6 SUBRETINALE INJEKTION  | 35        |
| 7 WESTERN BLOT   | 36        |
| 7.1 Proteinisolation aus Retina-Gewebe                                     | 36        |
| 7.2 SDS-Page und Western Blot  | 36        |
| 8 ELEKTRORETINOGRAMM   | 39        |
| 9 IMMUNHISTOCHEMIE   | 40        |
| 9.1 Präparation der Retina   | 40        |
| 9.2 Anfertigung von Kryo-Gewebeschnitten                                   | 40        |
| 9.3 Immunhistochemie   | 41        |
| 9.4 Mikroskopie  | 42        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 10          | DAS MORRIS WATER MAZE ALS SEHTEST .....                               | 43        |
| 11          | DATENANALYSE .....  | 45        |
| <b>IV</b>   | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>46</b> |
| 1           | DESIGN, PRODUKTION UND INJEKTION DES RHO-CNGB1A AAV-VEKTORS .....     | 46        |
| 2           | BIOCHEMISCHE UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER GENEXPRESSION ..... | 48        |
| 3           | EVALUATION DER NETZHAUTFUNKTION DURCH ELEKTRORETINOGRAMME.....        | 51        |
| 4           | UNTERSUCHUNG DER SEHFÄHIGKEIT ANHAND EINES SEHTESTS .....             | 56        |
| 5           | EINFLUSS DER GENTHERAPIE AUF DIE RETINALE DEGENERATION.....           | 59        |
| <b>V</b>    | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>68</b> |
| 1           | EFFIZIENZ DER GENSATZTHERAPIE BEI CNGB1-DEFIZIENTEN MÄUSEN .....      | 68        |
| 2           | ANSÄTZE ZUR THERAPIE VON RETINALEN DYSTROPHIEN .....                  | 70        |
| 3           | AUSBLICK.....   | 76        |
| <b>VI</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>VII</b>  | <b>REFERENZEN.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>VIII</b> | <b>ANHANG .....</b>   | <b>92</b> |
| 1           | ABKÜRZUNGEN .....   | 92        |
| 2           | PUBLIKATIONEN .....   | 94        |
| 3           | LEBENS LAUF .....   | 95        |
| 4           | DANKSAGUNG .....  | 96        |

## I Einleitung

### 1 Retinitis pigmentosa

Unter Retinitis pigmentosa versteht man eine erbliche degenerative Erkrankung der Netzhaut, von der weltweit etwa 3 Millionen Menschen – in Deutschland etwa 30 000 - 40 000 – betroffen sind (Zobor and Zrenner, 2012). Mit einer Prävalenz von 1:4000 stellt Retinitis pigmentosa die häufigste Form erblicher retinaler Dystrophien dar (Hamel, 2006; Hartong et al., 2006).

Das Erkrankungsalter, der Verlauf und das Ausmaß des Sehverlustes hängen vom jeweiligen Gendefekt ab, aber die Symptome ähneln sich in den meisten Fällen. In der Regel leiden Patienten bereits im Jugendalter unter Nachtblindheit. Im Laufe der Erkrankung engt sich das Gesichtsfeld von der Peripherie zum Zentrum immer weiter ein (Tunnelblick). Die Patienten können sich in diesem Stadium nur schwer orientieren, während die Möglichkeit zu lesen noch erhalten ist (Abb. 1). Im weiteren Verlauf sind zunehmend zentrale Netzhautareale, insbesondere die Fovea centralis, der Ort des Farb- und des schärfsten Sehens, von der Erkrankung betroffen. In diesem Stadium erfolgen eine progrediente beidseitige Visusminderung, Farbsinnstörungen und zentrale Gesichtsfeldausfälle. Dadurch verlieren die Patienten auch die Fähigkeit zu lesen. Im Spätstadium der Erkrankung kommt es schließlich häufig zur Blindheit (Daiger et al., 2007; Sahel et al., 2010).

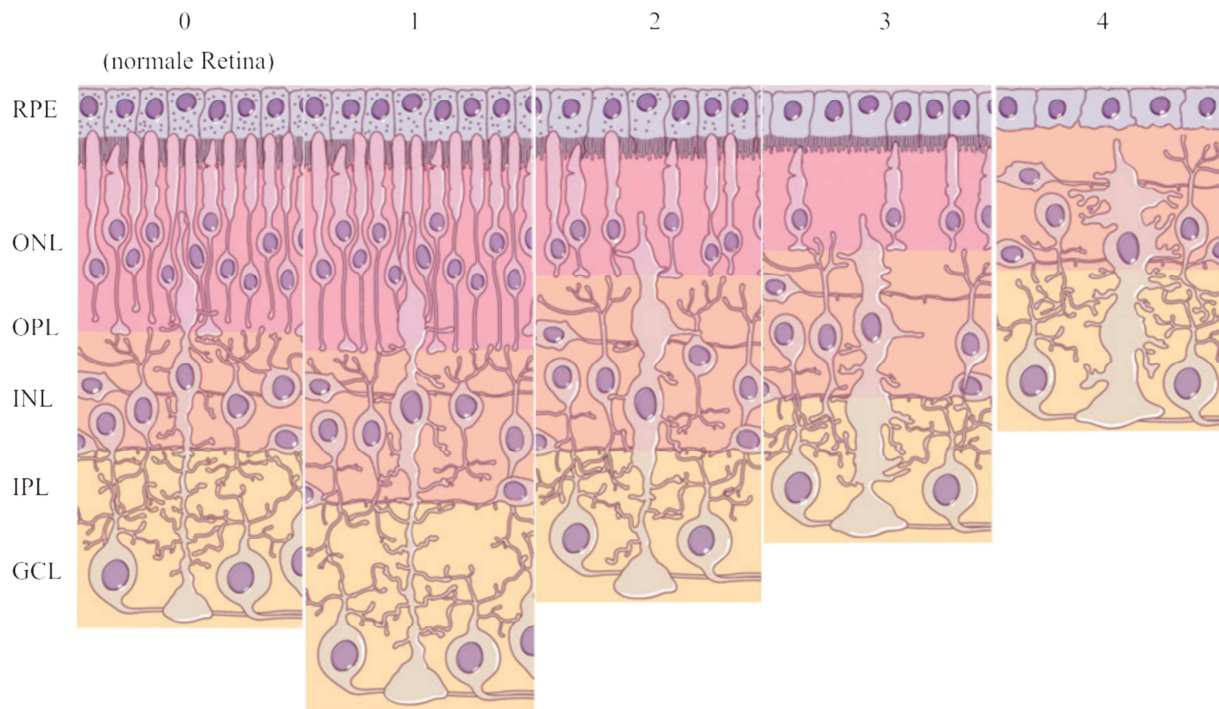


**Abb. 1: Retinitis Pigmentosa-Betroffener beim Zeitungslesen.** Beim klassischen Verlauf der Retinitis pigmentosa engt sich das Gesichtsfeld von der Peripherie her immer weiter ein (Tunnelblick). Dies erklärt den scheinbaren Widerspruch von Blindenstock und Zeitungslesen – für die Orientierung im Raum ist der Blindenstock bereits erforderlich, aber der kleine Sehrest im Zentrum ermöglicht noch das Lesen. Modifiziert nach [http://www.pro-retina.de/dateien/bilder/KLe\\_RP\\_Betroffener\\_mit\\_Tunnelblick.jpg](http://www.pro-retina.de/dateien/bilder/KLe_RP_Betroffener_mit_Tunnelblick.jpg)

Den Symptomen liegt auf zellulärer Ebene eine langsam fortschreitende Degeneration der beiden Fotorezeptortypen in der Retina zugrunde. Die pathohistologischen Veränderungen, die im Verlauf der Retinitis pigmentosa auftreten, kann man in fünf Stadien einteilen (Jacobson and Cideciyan, 2010) (Abb. 2).

Im Stadium 0 lassen sich bei Patienten mit Retinitis pigmentosa trotz mancher Funktionsdefizite noch keine morphologischen Veränderungen der Netzhaut feststellen. Im Frühstadium der Erkrankung (Stadium 1) ist die Netzhaut verdickt. Die Erkrankung wird klinisch evident, sobald die Degeneration der Fotorezeptoren beginnt (Stadium 2 und 3). Zunächst verkürzen sich die Außensegmente der Fotorezeptoren (Fariss et al., 2000; Milam et al., 1998). Parallel zu den degenerativen Veränderungen der Fotorezeptoren entsteht im retinalen Pigmentepithel zunächst eine Hyper- und später eine Depigmentierung sowie eine intraretinale Migration von retinalen Pigmentzellen (Li et al., 1995b). Schließlich kommt es zum Verlust der Fotorezeptoren. Die Stäbchen, welche dem Sehen bei geringer Lichtintensität dienen (skotopisches Sehen), sterben zuerst; der Untergang der Zapfen, die beim Menschen nahezu ausschließlich in der Fovea centralis der Netzhaut konzentriert sind und die Farbwahrnehmung ermöglichen (photopisches Sehen), erfolgt in einem späteren Stadium der Erkrankung (Berson, 1996). Durch das Absterben der Stäbchen und Zapfen nimmt die Schichtdicke der äußeren Körnerschicht der Retina sukzessive ab (Fariss et al., 2000; Milam et al., 1998).

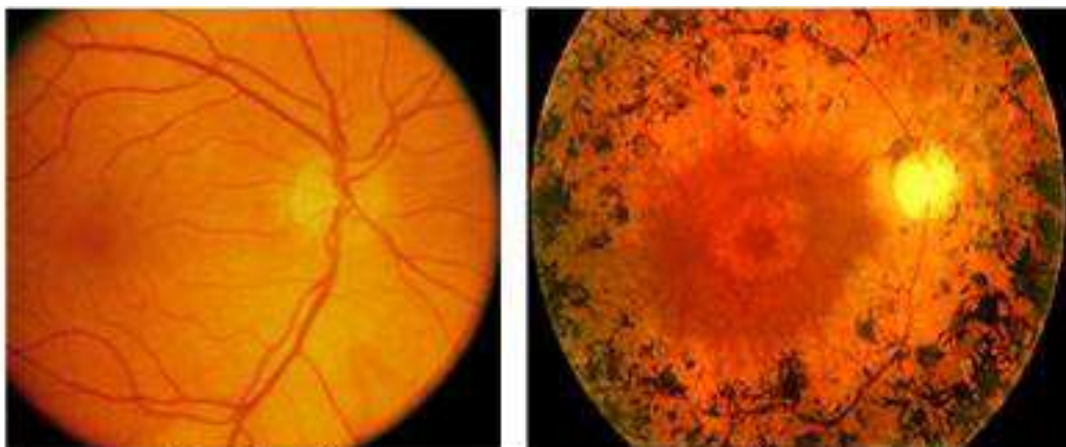
Das Spätstadium der Erkrankung (Stadium 4) ist durch einen massiven Untergang der beiden Fotorezeptoren charakterisiert. Parallel dazu entwickelt sich eine ausgeprägte Müllerzell-Gliose (Bringmann et al., 2006); außerdem wachsen die Dendriten der Horizontal- und der Amakrinzellen in die äußere Körnerschicht ein (sprouting) (Fariss et al., 2000; Li et al., 1995a). Die Schichtdicke der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht ändert sich kaum (Santos et al., 1997; Stone et al., 1992).



**Abb. 2: Verlauf der Degeneration bei Retinitis pigmentosa.** Im Stadium 0 sind noch keine morphologischen Veränderungen der Retina festzustellen; die Struktur entspricht der normalen Netzhautarchitektur, bestehend aus der äußeren Körnerschicht (outer nuclear layer, ONL), welche die Zellkerne der Fotorezeptoren enthält, der inneren Körnerschicht (inner nuclear layer, INL), in welcher die Zellkerne der Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen lokalisiert sind, und der Ganglienzellschicht (ganglion cell layer, GCL), in welcher die Zellkerne der Ganglienzellen liegen. Die Synapsen der Fotorezeptoren sind mit den Synapsen der Bipolar- und Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht (outer plexiform layer, OPL) verschaltet. Die Bipolar- und Amakrinzellen stehen mit den Ganglienzellen in der inneren plexiformen Schicht (inner plexiform layer, IPL) in Kontakt. Im Stadium 1 verdickt sich die Netzhaut bei Retinitis pigmentosa-Patienten. In den Stadien 2 und 3 kommt es zu einer Verkürzung der Außensegmente, einer Abnahme der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht auf Grund des Absterbens der Fotorezeptoren und einer Depigmentierung des retinalen Pigmentepithels (RPE). Im Spätstadium der Erkrankung (4) ist die äußere Körnerschicht verschwunden; des Weiteren entwickelt sich eine Müllerzell-Gliose. Modifiziert nach (Jacobson and Cideciyan, 2010).

Den progredienten Funktionsverlust der Fotorezeptoren kann man klinisch bereits in frühen Krankheitsstadien mit Hilfe der Elektroretinographie erfassen (Berson, 2007). Bei diesem Test werden Lichtreize zunehmender Intensität appliziert und die daraufhin von der Netzhaut gebildeten elektrischen Potenziale mittels Elektroden aufgezeichnet. Man unterscheidet zwischen skotopischen (dunkeladaptierten) und photopischen (helladaptierten) Bedingungen, um die Funktion der Stäbchen bzw. der Zapfen selektiv zu testen. Die Antworten der Fotorezeptoren spiegeln sich in der a-Welle wider; die Funktion der Bipolar- und Müllerzellen kann man durch eine Analyse der b-Welle beurteilen (Seeliger et al., 2001b). Bei der Retinitis pigmentosa ist bereits sehr früh im Krankheitsverlauf die a-Wellenamplitude der Stäbchenantwort reduziert. Das Zapfen-ERG erscheint zunächst wenig beeinträchtigt; mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es aber auch bei den Zapfen zu einer deutlichen Funktionsminderung (Bystander-Effekt). Im Endstadium der Erkrankung kann man elektrophysiologisch keine reproduzierbaren Antworten mehr ableiten (Sandberg et al., 1996).

Bei der klinischen Untersuchung des Augenhintergrunds zeigen sich zunächst Veränderungen in der mittleren Peripherie: Man sieht kleine, durch sehr feine Ausläufer miteinander verbundene Pigmentflecken, ähnlich dem Aussehen von Knochenkörperchen (Abb. 3). Diese Hyperpigmentation ist namensgebend für die Erkrankung Retinitis pigmentosa. Sie entsteht durch die intraretinale Migration des retinalen Pigmentepithels in Lücken, die durch das Absterben der Fotorezeptoren frei werden. Weitere typische Veränderungen des Augenhintergrunds sind verengte Arterien und Venen sowie eine wachsgelb gefärbte Papille als Folge der Atrophie des Sehnervs. Im späteren Verlauf ist eine Sklerose der Aderhaut-Gefäße zu beobachten (Li et al., 1995b).



**Abb. 3: Augenhintergrund eines gesunden Menschen (links) und eines Patienten mit Retinitis pigmentosa (rechts).** Bei Patienten mit Retinitis pigmentosa kommt es zu einer knochenkörperartigen Pigmentablagerung, Gefäßverengungen und einer wachsgelben Papille. Modifiziert nach (Friedrich Miescher institute for biomedical research)

Retinitis pigmentosa stellt genetisch eine sehr heterogene Erkrankung dar. Sie kann autosomal-dominant (30-40%), autosomal-rezessiv (50-60%) oder X-chromosomal (5-15%) vererbt werden. In sehr seltenen Fällen wird die Erkrankung durch Mutationen in der mitochondrialen DNA oder in zwei Genen (digenisch) verursacht (Hartong et al., 2006). Retinitis pigmentosa kann auch mit extraretinalen Krankheitssymptomen assoziiert sein, zum Beispiel mit Hörstörungen (Usher-Syndrom), mit Muskelschwäche, Adipositas, mentaler Retardierung, Polydaktylie und Nierenfunktionsstörungen (Bardet-Biedl-Syndrom) oder mit Geruchs- und Geschmackssinnesstörungen sowie Knochenerkrankungen (Refsum-Syndrom) (König, 2003; Weinstein, 1999).



Bisher wurden über 50 verschiedene Gene identifiziert, deren Mutationen für unterschiedliche Formen der Retinitis pigmentosa verantwortlich sind (RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/>). In etwa 40% der Krankheitsfälle kennt man die Gene allerdings noch nicht; durch die Entwicklung der *Next-Generation-Sequencing*-Technologie, der massiven parallelen Sequenzierung einer Vielzahl von Genen, können künftig vermutlich noch mehr ursächliche Mutationen identifiziert werden (Kohl and Biskup, 2012).

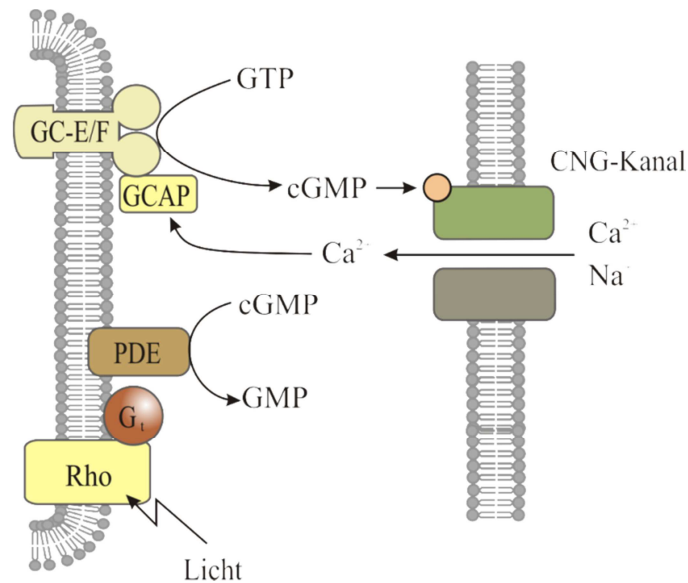
Die meisten Proteine, die durch ein Retinitis pigmentosa-Gen kodiert sind, spielen eine Rolle bei der visuellen Signaltransduktion, das heißt bei der Umwandlung von Lichtreizen in elektrische Potenziale in den Außensegmenten der Stäbchen (Ferrari et al., 2011). Beispielsweise sind über 120 verschiedene Mutationen im Rhodopsin-Gen bekannt, die für 25% aller autosomal-dominanten Krankheitsfälle verantwortlich sind (Audo et al., 2010; Dryja et al., 1991; Pan et al., 2012; Schuster et al., 2005). Des Weiteren wurden Mutationen im S-Arrestin (SAG) (Nakazawa et al., 1998), in den Untereinheiten der retinalen Phosphodiesterase (PDE6A oder PDE6B) (Dryja et al., 1999; McLaughlin et al., 1995) und des Zyklonukleotid-aktivierten Ionenkanals der Stäbchen (CNGA1 oder CNGB1) nachgewiesen (Bareil et al., 2001; Dryja et al., 1995; Kondo et al., 2004; Simpson et al., 2011).

Mittlerweile stehen zahlreiche genetische Mausmodelle für Retinitis pigmentosa zur Verfügung, mit deren Hilfe man die Pathomechanismen der Retinadegeneration aufklären und Grundlagen für neue therapeutische Ansätze legen kann (den Hollander et al., 2010).

## 2 CNGB1-defiziente Mäuse als Modell für Retinitis pigmentosa

Etwa 5% aller autosomal-rezessiven Retinitis pigmentosa-Fälle werden durch Mutationen im Zyklonukleotid-aktivierten (cyclic nucleotide-gated, CNG) Ionenkanal der Stäbchen verursacht (Hartong et al., 2006). Der CNG-Kanal nimmt eine Schlüsselposition bei der visuellen Signaltransduktion ein: Er fungiert als molekularer Schalter, der lichtvermittelte Änderungen der zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Konzentration in elektrische Potenziale umsetzt.

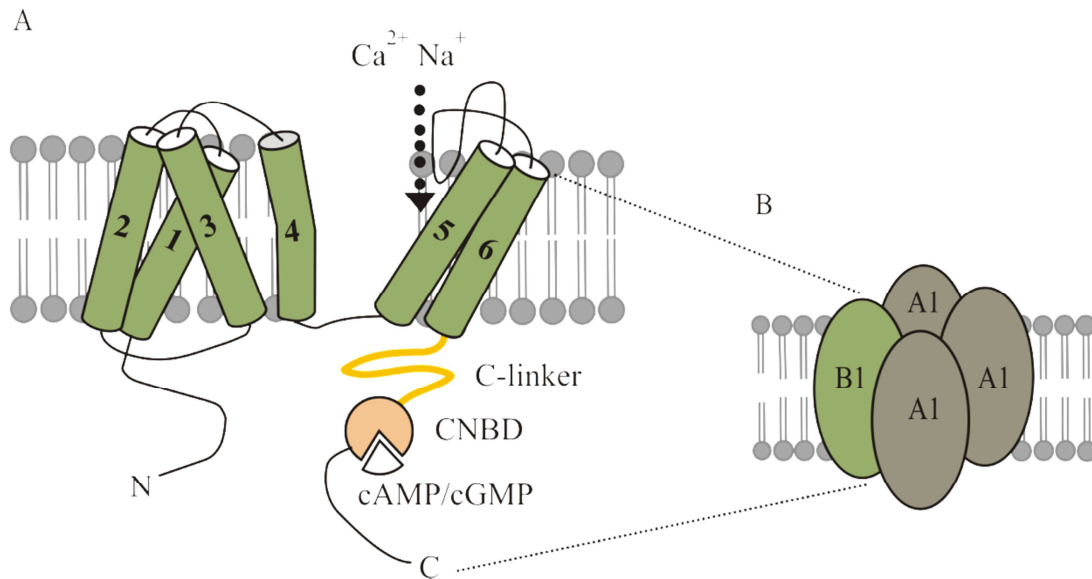
Im Dunkeln ist der CNG-Kanal auf Grund der hohen cGMP-Konzentration geöffnet; es kommt zu einem Einstrom von Natrium und Calcium, und die Zelle wird auf -40 mV depolarisiert. Bei Licht wird die cGMP-Konzentration reduziert, was zu einer Schließung der CNG-Kanäle und daher zu einer Hyperpolarisation der Zelle von -40 mV auf -70 mV führt. Diese Grundeigenschaft des CNG-Kanals ist essentiell für den Ablauf der visuellen Signaltransduktion: Licht aktiviert den G-Protein gekoppelten Rezeptor Rhodopsin, der aus einem Glykoprotein (Opsin) sowie einer chromophoren Gruppe (Retinal) besteht. Die Lichtabsorption bewirkt eine Isomerisierung des Retinals von der 11-*cis*- in die all-*trans*-Form, was in einer Konformationsänderung des Opsins zu Metarhodopsin II resultiert. Metarhodopsin II stimuliert das G-Protein Transduzin, das wiederum die retinale Phosphodiesterase (PDE6) aktiviert. Die PDE6 ist ein Enzym, das cGMP in Guanosinmonophosphat (5'-GMP) spaltet. Die PDE-abhängige Reduktion der cGMP-Konzentration führt zu einer Schließung der CNG-Kanäle und daher zu einer Hyperpolarisation der Zelle von -40 mV auf -70 mV (Abb. 4). Die Hyperpolarisation der Zelle bewirkt, dass sich die präsynaptischen spannungsgesteuerten Calciumkanäle schließen und der Neurotransmitter Glutamat nicht weiter aus den synaptischen Endigungen der Stäbchen freigesetzt wird (Arshavsky and Burns, 2012; Luo et al., 2008). Die hemmenden Ionenkanäle der Bipolarzellen schließen sich; in den nachgeschalteten Ganglienzellen können wieder Aktionspotenziale entstehen. Diese elektrischen Signale werden letztlich über den Sehnerv und die zentrale Sehbahn in den visuellen Kortex des Gehirns weitergeleitet und dort verarbeitet (Krizaj and Copenhagen, 2002; Wässle, 2004).



**Abb. 4: Die visuelle Signaltransduktion in den Stäbchen.** Die visuelle Signaltransduktion bezeichnet die Umwandlung eines Lichtreizes in ein elektrisches Potenzial. Die Absorption von Licht bewirkt eine Konformationsänderung des Rhodopsins (Rho), wodurch das G-Protein Transduzin (G<sub>t</sub>) aktiviert wird. Dieses wiederum stimuliert die Phosphodiesterase (PDE), die cGMP spaltet. Die Abnahme der cGMP-Konzentration führt zu einer Schließung des CNG-Kanals und folglich zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Die Regeneration von cGMP erfolgt über das Guanylylzyklase-aktivierende Protein (GCAP), das die Guanylylzyklase (GC-E/F) stimuliert. Modifiziert nach (Biel and Michalakis, 2009).

Auch die Adaption des Systems an die Lichtverhältnisse wird über einen durch den CNG-Kanal vermittelten Feedback-Mechanismus gesteuert. Im Dunkeln inhibiert das durch den CNG-Kanal einströmende Calcium das Guanylylzyklase-aktivierende-Protein (GCAP); die Guanylylzyklase ist folglich inaktiv und produziert kein cGMP. Licht bewirkt das Schließen der CNG-Kanäle, so dass Calcium nicht mehr in die Zelle fließt. Die Reduktion der Calciumkonzentration stimuliert GCAP, das die cGMP-synthetisierende Guanylylzyklase aktiviert. Mit ansteigender cGMP-Konzentration öffnen sich die CNG-Kanäle; es kommt zu einer langsamen Depolarisation – auch dann, wenn der Lichtreiz noch anhält (Luo et al., 2008; Palczewski et al., 2004).

Der CNG-Kanal in den Stäbchen ist aus drei CNGA1- und einer CNGB1a-Untereinheit aufgebaut (Weitz et al., 2002; Zheng et al., 2002; Zhong et al., 2002), die je aus sechs Transmembransegmenten bestehen (Abb. 5). Es sind sowohl Mutationen im CNGB1-Gen als auch Mutationen im CNGA1-Gen identifiziert worden, die eine schwere autosomal-rezessive Verlaufsform der Retinitis pigmentosa verursachen (Bareil et al., 2001; Dryja et al., 1995; Kondo et al., 2004; Simpson et al., 2011).



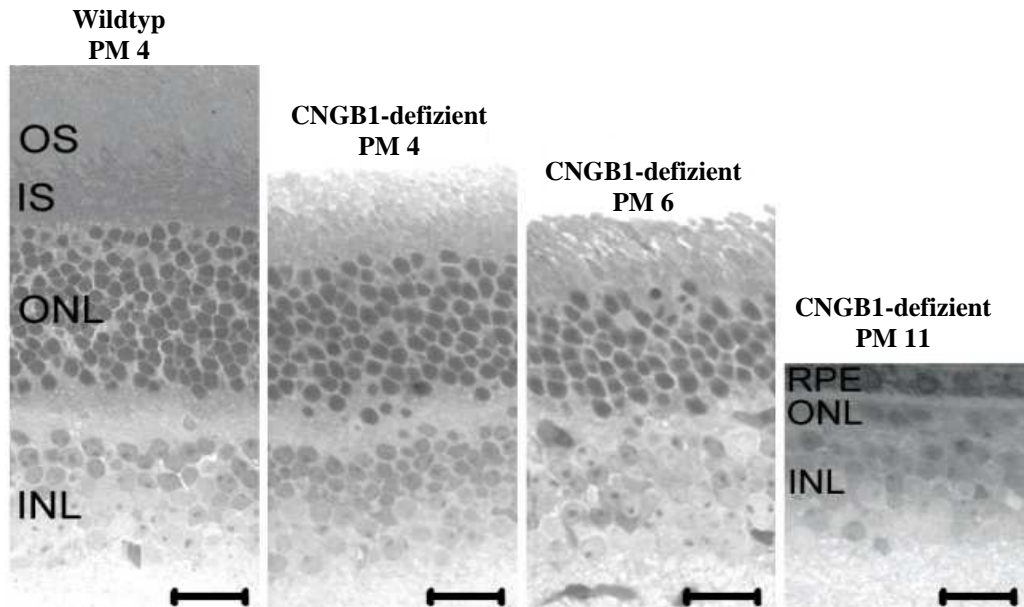
**Abb. 5: (A) Modell einer CNG-Kanal-Untereinheit.** Jede Untereinheit besteht aus sechs Transmembransegmenten (1-6) und den intrazellulär gelegenen N- und C-Termini. Der C-Terminus enthält einen C-Linker und eine Zyklonukleotidbindungsstelle (CNBD). Die Bindung von cAMP oder cGMP führt zu einer Konformationsänderung des CNG-Kanals und dadurch zur Öffnung der Pore, die den Durchtritt von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )- und Natrium ( $\text{Na}^{+}$ )-Ionen ermöglicht. Modifiziert nach (Biel and Michalakis, 2009). **(B) Modell des Stäbchen-CNG-Kanals.** Der CNG-Kanal in den Stäbchen besteht aus drei CNGA1- und einer CNGB1-Untereinheit.

Beide CNG-Kanal-Untereinheiten sind für die Funktion bei der visuellen Signaltransduktion essentiell. In heterologen Expressionssystemen können zwar auch CNGA-Untereinheiten zu funktionellen homomeren Kanälen assemblieren, aber *in vivo* sind diese homotetrameren CNGA-Kanäle kaum nachweisbar. Außerdem zeichnen sich die heterotetrameren Kanäle im Vergleich zu den homotetrameren CNGA-Kanälen durch eine höhere Sensitivität gegenüber cAMP sowie dem Inhibitor *L-cis*-Diltiazem aus, werden durch Calmodulin besser und durch extrazelluläres Calcium schwächer blockiert (Chen et al., 1994; Chen et al., 1993; Körschen et al., 1995). Die CNGB-Untereinheit ist *in vivo* für den effektiven Transport der heteromeren Kanäle zum Zielort erforderlich (Hüttl et al., 2005; Jenkins et al., 2006; Kizhatil et al., 2009; Michalakis et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CNGB1-defiziente Mäuse als präklinisches Mausmodell für Retinitis pigmentosa verwendet. Das CNGB1-Gen besteht aus 33 Exons, die unterschiedlich gespleißt werden können (Ardell et al., 2000). Die CNGB1a-Untereinheit ist die stäbchenspezifische Spleißvariante des CNGB1-Gens (Chen et al., 1993). Neben der CNGB1a-Isoform gibt es die CNGB1b-Variante, die in den olfaktorischen Neuronen exprimiert wird (Bönigk et al., 1999; Sautter et al., 1998). Bei den verwendeten CNGB1-defizienten Mäusen wurde das Exon 26, das an der Porenbildung beteiligt ist und die sechste Transmembrandomäne kodiert, deletiert. Die Deletion des Exons 26 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens, so dass ein Stopcodon am Anfang des Exons 27 entsteht und die Translation beendet wird (Hüttl et al., 2005). Der retinale Phänotyp von CNGB1-defizienten Mäusen entspricht den histologischen und funktionellen Veränderungen von humanen Patienten mit Retinitis pigmentosa.

Die fehlende Expression des CNGB1-Proteins bei CNGB1-defizienten Mäusen führt dazu, dass auch das CNGB1-Protein nur in äußerst geringen Mengen exprimiert und fast nicht in die Außensegmente transportiert wird. In den Stäbchen werden keine CNG-Kanäle gebildet (Hüttl et al., 2005). Das Fehlen der CNG-Kanäle hat zur Folge, dass die Stäbchen funktionslos sind. Im Elektroretinogramm lassen sich keinerlei elektrische Antworten auf Lichtreize, die nur das skotopische System aktivieren, ableiten. Die Zapfenantworten sind bis zu einem Alter von sechs Monaten normal, verschlechtern sich dann aber zunehmend. Im Alter von einem Jahr sind CNGB1-defiziente Mäuse nahezu blind (Hüttl et al., 2005).

Die progrediente Funktionseinschränkung der Zapfen ist auf eine langsame Degeneration der Netzhaut zurückzuführen (Hüttl et al., 2005). Wie bei der humanen Erkrankung sterben zuerst die Stäbchen und dann die Zapfen. Das Absterben der Fotorezeptoren spiegelt sich in der abnehmenden Schichtdicke der äußeren Körnerschicht, welche die Zellkerne der Zapfen und Stäbchen enthält, wider: Im Alter von vier Monaten sind zwei bis vier Zellreihen weniger als bei einer Wildtyp-Maus vorhanden. Bei sechs Monate alten CNGB1-defizienten Mäusen sind die Fotorezeptoren um die Hälfte reduziert. Weitere fünf Monate später ist die äußere Körnerschicht fast vollständig verschwunden (Hüttl et al., 2005) (Abb. 6). Die Schichtdicke der inneren Körnerschicht verändert sich nicht; allerdings bilden die Stäbchen-Bipolarzellen und die Horizontalzellen lange neuronale Fortsätze bis in die äußere Körnerschicht (Hüttl et al., 2005). Die Außensegmente der Stäbchen, ursprünglich morphologisch intakt, verkürzen sich bereits im Alter von 15 Tagen, so dass bei vier Monate alten CNGB1-defizienten Mäusen die Außensegmente signifikant kürzer sind (Hüttl et al., 2005).



**Abb. 6: Degeneration der Fotorezeptoren bei CNGB1-defizienten Mäusen.** Der Vergleich einer Retina einer vier Monate alten Wildtyp-Maus mit den Retinae von CNGB1-defizienten Mäusen im Alter von vier (PM4), sechs (PM6) und elf Monaten (PM11) zeigt eine deutliche Abnahme der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht (ONL), welche die Zellkerne der Fotorezeptoren enthält, im Laufe der Zeit. Der Maßstabsbalken markiert 50 µm. OS, Außensegment; IS, Innensegment; INL, innere Körnerschicht; RPE, retinales Pigmentepithel. Modifiziert nach (Hüttl et al., 2005).

Die langsame Degeneration der Retina von CNGB1-defizienten Mäusen ähnelt dem humanen Krankheitsverlauf, so dass diese Mäuse sehr gut geeignet sind, um eine Therapie für Retinitis pigmentosa zu entwickeln.

### 3      **Genersatztherapie**

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte im Verständnis der pathologischen und molekularen Vorgänge erzielt, die zu Retinitis pigmentosa führen (Marigo, 2007; Sahaboglu et al., 2013). Viele der krankheitsauslösenden Gene sind identifiziert worden, so dass eine Behandlung der bislang unheilbaren Erkrankung durch eine Genersatztherapie möglich werden könnte.

Das Prinzip der Genersatztherapie besteht bei autosomal-rezessiven Erberkrankungen darin, das mutierte Gen durch ein intaktes zu ersetzen. Das intakte Gen wird mittels Gentransfer in die Zelle eingeschleust. Das hat zur Folge, dass das entsprechende funktionelle Protein produziert wird und die Zelle ihre ursprüngliche Funktion wieder erfüllen kann. Für den therapeutischen Gentransfer gibt es zahlreiche nichtvirale (zum Beispiel Liposomen, DNA-Nanopartikel) und virale (zum Beispiel Adenoviren, Lentiviren, Retroviren, adeno-assoziierte Viren) Vektoren (Cao et al., 2011). Als besonders viel versprechend hat sich der Gentransfer mittels adeno-assoziiierter Viren erwiesen (Buch et al., 2008; Coura Rdos and Nardi, 2007; Daya and Berns, 2008). Vor über 15 Jahren wurde das erste Mal mit Hilfe von rAAV-Vektoren ein Reportergen – das LacZ-Gen – in die Retina von Mäusen eingebracht (Ali et al., 1996). Eine Studie am Mausmodell für PDE6B ergab erstmals Hinweise, dass diese Form der Therapie erfolgreich sein könnte (Jomary et al., 1997). Seitdem wurden zahlreiche weitere Gentherapien an Tiermodellen für Retinitis pigmentosa und für andere retinale Dystrophien durchgeführt (den Hollander et al., 2010; Smith et al., 2012).

Das Auge eignet sich besonders gut für eine virale Genersatztherapie, da

- 1) es auf Grund der Blut-Retina-Schranke immunprivilegiert ist, das heißt, die Immunantwort des Körpers ist limitiert oder nicht vorhanden (Caspi, 2006; McKenna and Kapp, 2004).
- 2) durch die Kompartimentierung und die geringe Größe des Organs bereits kleine Mengen viraler Vektoren für eine erfolgreiche Therapie ausreichen (Buch et al., 2008; Dinculescu et al., 2005; Surace and Auricchio, 2003).
- 3) das Auge chirurgisch leicht erreichbar ist (Bennett et al., 2012).
- 4) zur Beurteilung des therapeutischen Effekts etablierte funktionelle Tests, wie Elektretinographie, und nichtinvasive bildgebende Verfahren zur Verfügung stehen (Kellner et al., 2009).

## 4 Adeno-assoziierte Viren

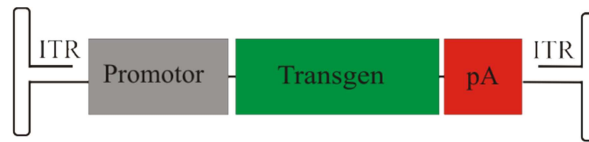
Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind nicht-pathogene (Sun et al., 2003) einzelsträngige DNA-Viren, die eine Vielzahl von ruhenden oder sich teilenden Zellen infizieren (Hallek et al., 1998). Sie gehören zur Gattung der Dependoviren und zur Familie der Parvoviridae. Die AAVs benötigen – wie alle Dependoviren – für die Replikation ihres Genoms ein Helfervirus, zum Beispiel ein Adenovirus (Atchison et al., 1965; Buller et al., 1981; Osten et al., 2007). Das Kapsid eines einzelnen Virusteilchens ist etwa 20 nm groß und verpackt ein Genom von 4,7 kilobasen (kb) (Berns and Giraud, 1996). Das Genom besteht aus zwei Genen: dem Replikations (Rep)-Gen und dem Kapsid (Cap)-Gen (Abb. 7). Das Rep-Gen kodiert vier Proteine (Rep40, Rep52, Rep68 und Rep78), welche die Replikation regulieren. Das Cap-Gen kodiert drei Proteine (VP1, VP2 und VP3), welche die ikosaedrale Hülle des Virus bilden (Linden and Berns, 2000). Der kodierende Bereich wird von zwei inverted terminal repeats (ITRs) flankiert (Abb. 7). Jedes ITR besteht aus einer palindromischen Sequenz von 145 Nukleotiden und kann eine T-förmige Haarnadelstruktur ausbilden. Die ITRs spielen eine entscheidende Rolle bei der Verpackung einzelsträngiger AAV-Genome sowie der Replikation (Berns and Giraud, 1996).



**Abb. 7: Organisation des AAV-Genoms.** Das AAV-Genom (4,7 kb) besteht aus dem Replikations (Rep)- und dem Kapsid (Cap)-Gen, die von zwei inverted terminal repeats (ITRs) flankiert werden.

Für die Gentherapie werden rekombinante AAV (rAAV)-Vektoren verwendet, die nicht ins Genom integrieren, sondern episomal verbleiben. Die rAAV-Vektoren enthalten die beiden flankierenden ITRs, welche die einzig erforderlichen *cis*-Elemente für die Vektor-Konstruktion darstellen (Rabinowitz and Samulski, 1998). Das Rep- und das Cap-Gen können aus dem Genom entfernt und *in trans* durch Helferplasmide exprimiert werden (Hermonat and Muzyczka, 1984; Tratschin et al., 1984). Dadurch ist es möglich, die gesamte virale kodierende Sequenz durch eine Expressionskassette mit einer maximalen Größe von 5,2 kb zu ersetzen (Dong et al., 2010; Lai et al., 2010; Wu et al., 2010). Die Expressionskassette besteht aus einem Promotor, dem Transgen und dem Polyadenylierungssignal, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielt (Abb. 8).

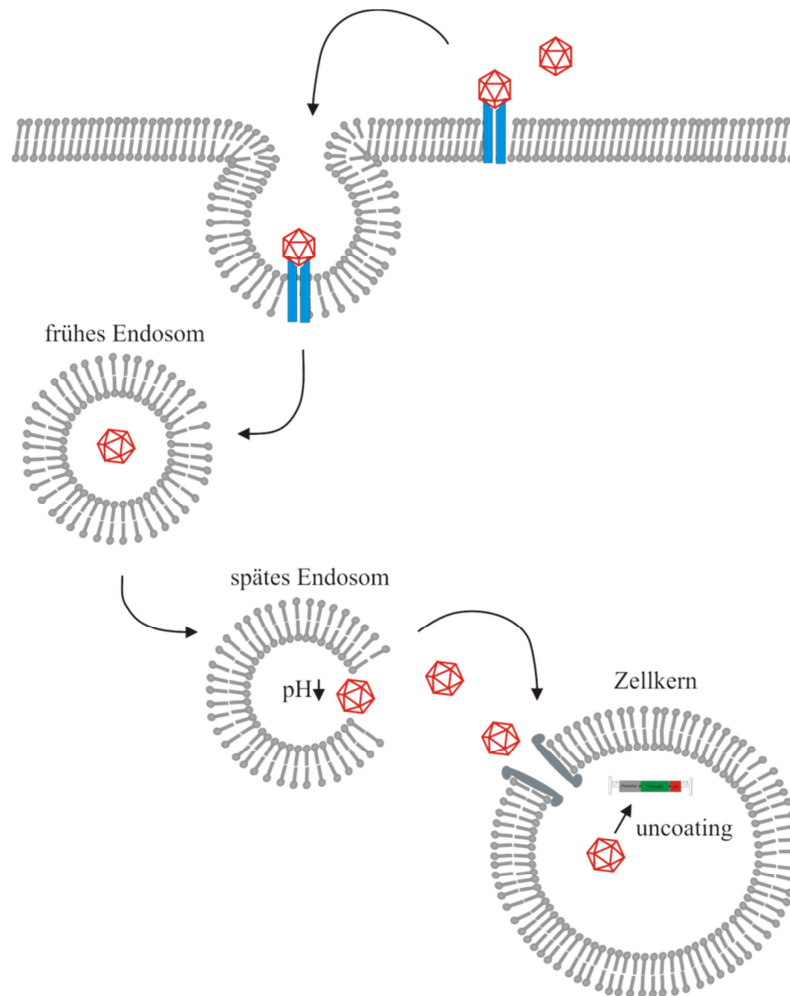




**Abb. 8: Organisation des rAAV-Genoms.** Das rAAV-Genom besteht aus den beiden inverted terminal repeats (ITRs) und einer Expressionskassette, die sich aus einem Promotor, dem Transgen und dem Polyadenylierungssignal (pA) zusammensetzt.

Der Transport der rAAVs in eine Zelle (Transduktion) beginnt mit der Bindung des Virions an die Oberfläche der Zielzelle über einen oder mehrere Rezeptoren/Korezeptoren (Büning et al., 2008) (Abb. 9). Als primärer Rezeptor für AAV-2 wurde der Heparin-Sulfat-Proteoglycan-Rezeptor (Summerford and Samulski, 1998), als Korezeptoren der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (Qing et al., 1999), der Laminin-Rezeptor (Akache et al., 2006), der Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (Kashiwakura et al., 2005), Integrin  $\alpha v \beta 5$  (Summerford et al., 1999) oder Integrin  $\alpha v \beta 1$  (Asokan et al., 2006) identifiziert. Nach der Bindung folgt die Internalisierung mittels Endozytose: Es kommt zu einer Einstülpung der Zellmembran, welche den Virus-Rezeptor-Komplex enthält, gefolgt von einer Abschnürung des neu gebildeten Endosoms in das Zellinnere (Nonnenmacher and Weber, 2012) (Abb. 9). Der genaue Rezeptor-vermittelte Aufnahmemechanismus ist noch nicht geklärt, aber wahrscheinlich sind an der Internalisierung mehrere Endozytosewege beteiligt: die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolae-vermittelte Endozytose (Bartlett et al., 2000) und die CLIC/GEEC (clathrin-independent carriers/GPI-enriched endocytic compartment)-abhängige Endozytose (Nonnenmacher and Weber, 2011).

Nach der Internalisierung erfolgt der intrazelluläre Transport der Vesikel zum Zellkern. Hierfür ist die Ansäuerung der Endosomen eine notwendige Voraussetzung, da dies wahrscheinlich eine Loslösung der in den Endosomen gebundenen AAVs von den Membranrezeptoren bewirkt (Bartlett et al., 2000; Nonnenmacher and Weber, 2012; Sonntag et al., 2006). Eine Konformationsänderung des Kapsids, die in der Externalisierung der N-termini von VP1 und VP2 besteht, ermöglicht die Freisetzung der viralen Partikel aus dem Endosom (Sonntag et al., 2006) (Abb. 9). Über den Import der viralen Partikel durch den nuklearen Porenkomplex in den Zellkern ist wenig bekannt. Die Freisetzung der einzelsträngigen DNA (uncoating) erfolgt vermutlich erst im Zellkern, da intakte Virionen im Zellkern detektiert wurden (Bartlett et al., 2000; Johnson and Samulski, 2009; Sanlioglu et al., 2000). Nach der Umwandlung in doppelsträngige DNA kann die Transgenexpression starten (Abb. 9).



**Abb. 9: Transduktionsprozess der rAAV2-Vektoren.** Nach der Bindung an einen Rezeptor/Co-Rezeptor Komplex folgt die Internalisierung mittels Endozytose. Das neu gebildete Endosom wird nach der Abschnürung Richtung Kern transportiert. Nach Ansäuerung des Endosoms und einer Konformationsänderung des Kapsids werden die viralen Partikel freigesetzt und durch einen nuklearen Porenkomplex in den Zellkern importiert. Im Nukleus erfolgt die Freisetzung der einzelsträngigen DNA (uncoating) und deren Replikation.

Abhängig vom Cap-Gen, sind viele verschiedene AAV-Serotypen identifiziert. Diese unterscheiden sich durch die Antigene auf ihrer Oberfläche und folglich in ihrem Tropismus, das heißt in ihrer Fähigkeit, bestimmte Zelltypen zu infizieren (Wu et al., 2006) (Tabelle 1). Durch Pseudotypisierung, das heißt durch Verpackung von AAV-Genomen in Kapside anderer Serotypen, kann der Tropismus gezielt verändert und optimiert werden (Axel, 2005; Rabinowitz et al., 2002). Die Verpackung des AAV2-Genoms in ein Kapsid des Serotyps 8 (rAAV2/8) führt beispielsweise zu einer deutlich verbesserten Transduktion der Fotorezeptoren (Allocca et al., 2007; Vandenberghe and Auricchio, 2012). Des Weiteren wurden Serotypen mit eingefügten Mutationen, z.B. die Substitution von Tyrosin (Y) mit Phenylalanin (F) an exponierten Stellen der Kapsidoberfläche, entwickelt. rAAV-Vektoren mit dieser veränderten Kapsidoberfläche zeigen eine signifikant effektivere Transduktion, da die viralen Partikel

auf Grund der fehlenden Phosphorylierung der exponierten Tyrosinreste nicht mehr degradiert werden (Petr-Silva et al., 2011; Petr-Silva et al., 2009).

**Tabelle 1: Tropismus der gängigen AAV-Serotypen**

| <b>Serotyp</b> | <b>Tropismus</b>  |
|----------------|---|
| AAV1           | Skelettmuskel (Chao et al., 2000), ZNS (Wang et al., 2003), retinales Pigmentepithel (Pang et al., 2008b), Pankreas (Loiler et al., 2005)   |
| AAV2           | Skelettmuskel (Manno et al., 2003), ZNS (Bartlett et al., 1998), Leber (Köberl et al., 1997), Niere (Takeda et al., 2004), retinales Pigmentepithel, Fotorezeptoren (Vandenberghe et al., 2011) |
| AAV3           | Leberzellkarzinom (Glushakova et al., 2009), Skelettmuskel (Chao et al., 2000)  |
| AAV4           | ZNS (Davidson et al., 2000), retinales Pigmentepithel (Weber et al., 2003)  |
| AAV5           | Skelettmuskel (Chao et al., 2000), ZNS (Davidson et al., 2000), Lunge (Seiler et al., 2006), Fotorezeptoren (Lebherz et al., 2008)  |
| AAV6           | Skelettmuskel (Blankinship et al., 2004), Herz (Zincarelli et al., 2010), Lunge (Halbert et al., 2001)  |
| AAV7           | Retina (Allocca et al., 2007), ZNS (Taymans et al., 2007)   |
| AAV8           | Skelettmuskel (Wang et al., 2005), ZNS (Taymans et al., 2007), retinales Pigmentepithel, Fotorezeptoren (Vandenberghe et al., 2011), Pankreas (Nakai et al., 2005), Herz (Wang et al., 2005)    |
| AAV9           | Leber, Herz (Inagaki et al., 2006), Gehirn (Foust et al., 2009), Zapfen (Vandenberghe et al., 2013)   |
| AAV10          | Fotorezeptoren (Watanabe et al., 2013), Skelettmuskel (Mori et al., 2004)   |
| AAV11          | Fotorezeptoren (Watanabe et al., 2013)  |
| AAV12          | Skelettmuskel (Schmidt et al., 2008), Speicheldrüse (Schmidt et al., 2008), olfaktorisches Epithel (Quinn et al., 2011)   |

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass rAAV-Vektoren – trotz der geringen Verpackungskapazität von 5,2 kb (Dong et al., 2010; Lai et al., 2010; Wu et al., 2010) – entscheidende Vorteile für den Gentransfer haben. Sie sind nicht-pathogen und lösen keine oder eine nur geringe Immunantwort aus (Sun et al., 2003). Eine unkontrollierte Replikation ist ausgeschlossen, da für die Vervielfältigung des Virus ein Helferplasmid benötigt wird (Atchison et al., 1965; Buller et al., 1981). Sie zeigen einen breiten spezifischen Tropismus (Rabinowitz et al., 2002; Yang et al., 2002) sowie eine stabile und effiziente Genexpression *in vivo* (Bennett et al., 1999; Flannery et al., 1997). Außerdem sind rAAVs relativ einfach und mit einem hohen Titer herzustellen.

## II Zielsetzung der Arbeit

Ziel meiner Arbeit war es, eine Gensatztherapie für das präklinische CNGB1-defiziente Mausmodell der Retinitis pigmentosa mittels rAAV-Vektoren zu entwickeln. Dazu sollten zunächst rAAV-Vektoren, die das CNGB1-Gen unter einem Stäbchen-spezifischen Promotor exprimieren, kloniert und produziert und anschließend subretinal in CNGB1-defiziente Mäuse injiziert werden. Der Erfolg der Gensatztherapie sollte anschließend auf zellulärer, histologischer und funktioneller Ebene analysiert werden, um folgende Fragestellungen zu klären:

- 1) Wird das durch den rAAV-Vektor eingeschleuste CNGB1-Gen in der Retina exprimiert und zum Zielort, in die Außensegmente der Stäbchen, transportiert?

Zur Beantwortung dieser Frage sollten Western Blot und immunhistochemische Untersuchungen der Retinae von injizierten CNGB1-defizienten Mäusen durchgeführt werden.

- 2) Bildet sich ein funktionsfähiger CNG-Kanal in den Stäbchen?

Die Netzhautfunktion sollte mit Hilfe von Elektroretinogrammen untersucht werden.

- 3) Können die injizierten CNGB1-defizienten Mäuse bei geringer Helligkeit wieder sehen? Da CNGB1-defiziente Mäuse von Geburt an nachtblind sind, sollte mit einem Verhaltensversuch getestet werden, ob das Gehirn die Signale korrekt verarbeitet.

- 4) Kann die Degeneration der Retina verlangsamt werden?

Diese Frage sollte durch immunhistochemische Langzeituntersuchungen von CNGB1-defizienten Mäusen nach der subretinalen Injektion geklärt werden.

### **III Material und Methoden**

#### **1 Chemikalien, Lösungen und Puffer**

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich, Roche oder Biorad in der Qualität „pro analysi“ oder „für molekularbiologische Zwecke“ bezogen. Zur Herstellung der Lösungen diente hochreines entionisiertes Wasser (Reinstwassersystem Easypure UV/UF, Werner GmbH).

#### **2 Verwendete Mauslinie**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CNGB1-defiziente Mäuse verwendet, bei denen mittels einer Cre/loxP-basierten Strategie das Exon 26 deletiert wurde (Hüttl et al. 2005). Die Deletion des Exons 26, das die Pore und das Transmembransegment 6 kodiert, führt zu einer Verschiebung des Leserahmens, so dass ein Stopcodon am Anfang des Exons 27 entsteht, das die Translation beendet (Hüttl et al., 2005). Die Maushaltung erfolgte gemäß den gesetzlichen Richtlinien. Die Mäuse wurden mit einem genetisch gemischten Hintergrund aus den Stämmen 129SvJ und C57-B16/N gezüchtet. Die rd8 (Crb1)-Mutation, die man kürzlich in verschiedenen nordamerikanischen und asiatischen Labormauslinien detektierte, und die den Verlauf der retinalen Degeneration maßgeblich beeinflussen kann (Mattapallil et al., 2012), ist in der bei dieser Arbeit verwendeten Mauslinie nicht nachweisbar. Die Tiere erhielten Futter (Haltungsfutter: R/M-H; Zuchtfutter: M-Z Extrudat, Ssniff) und Wasser *ad libitum* und lebten in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

### 3 Genotypisierung

#### 3.1 Isolierung genomischer DNA für die Genotypisierung

Zur Gewinnung von genomischer DNA für die Genotypisierung wurde ein kleines Stück der Schwanzspitze in 50 µl Proteinase K-Mix (44µl H<sub>2</sub>O, 5 µl Proteinase K-Puffer und 1 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche)) bei 55°C über Nacht verdaut. Nach einer 15-minütigen Denaturierung der Proteinase K bei 95°C konnte man das Lysat für die Genotypisierung verwenden.

##### Proteinase K-Puffer

|        |                  |
|--------|------------------|
| 100 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| 5 mM   | EDTA             |
| 0,2%   | SDS              |
| 200mM  | NaCl             |

#### 3.2 Polymerasekettenreaktion für die Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps (Wildtyp oder CNGB1 KO) wurde eine Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) mit den folgenden drei Primern (Eurofins MWG Operon) durchgeführt:

PSHV8F: 5`-CCTCATGCATGCGACCTGAAAT- 3`

PSHV6bR: 5`-GCCCAGACTAGAACACAAGTC-3`

PSHV9R: 5`-CACAGCCATTACACATAGCAGTG-3`

##### PCR-Ansatz für die Genotypisierung:

|         |                                      |
|---------|--------------------------------------|
| 1,25 µl | PSHV8F                               |
| 1,25 µl | PSHV6bR                              |
| 1,25 µl | PSHV9R                               |
| 4 µl    | Desoxyribonucleotide (dNTPs, 100 mM) |
| 2,5 µl  | 10x PCR Puffer                       |
| 2 µl    | Genomische DNA                       |
| 0,25 µl | TAQ                                  |
| 12,5 µl | H <sub>2</sub> O                     |

### PCR-Protokoll für die Genotypisierung:

|                            |      |        |             |
|----------------------------|------|--------|-------------|
| (1) Initiale Denaturierung | 94°C | 3 min  | } 30 Zyklen |
| (2) Denaturierung          | 94°C | 40 sek |             |
| (3) Primeranlagerung       | 57°C | 30 sek |             |
| (4) Elongation             | 72°C | 30 sek |             |
| (5) Finale Elongation      | 72°C | 5 min  |             |

### **3.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente**

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von unter 700 bp, wurden Agarosegele in einer Konzentration von 2% Agarose in TBE verwendet. Die Gele wurden durch Aufkochen der entsprechenden Menge Agarose (peqGOLD Universal-Agarose, Peqlab) in 1x TBE in einer Labormikrowelle angefertigt. Nach dem Abkühlen der Agarose auf 50 °C, wurde Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) in einer Konzentration von 800 ng/ml zugegeben und anschließend in entsprechende Gelträger gefüllt. Die PCR-Proben wurden mit Gel-Ladepuffer (6x Dye) versetzt, der die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol enthält. Diese Farbstoffe migrieren auch im Gel, so dass man den Verlauf der Elektrophorese verfolgen kann. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern bei 135 V, als Laufpuffer diente 1x TBE. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Standard aufgetragen (1 kb DNA Ladder, Invitrogen). Abschließend wurde die DNA unter UV-Licht (Gel Doc 2000, Biorad) sichtbar gemacht.

Bei einer Wildtyp-Maus wurde ein Genprodukt von 480 bp, bei einer CNGB1-defizienten Maus ein Genprodukt von 415 bp amplifiziert.

#### Gel-Ladepuffer (6xdye)

#### 10x TBE

|         |                |       |             |
|---------|----------------|-------|-------------|
| 60%     | TBE            | 0,9 M | TrisHCL     |
| 18%     | Ficoll Typ 400 | 0,9 M | Borsäure    |
| 0,12 mM | EDTA pH 8,0    | 20 mM | EDTA pH 8,0 |
| 0,15%   | Bromphenolblau |       |             |
| 0,15%   | Xylencyanol FF |       |             |



## 4 Klonierung des pAAV2.1-Rho-mCNGB1a-SV40-Vektors

### 4.1 Polymerasekettenreaktion für die Klonierung

Für die Klonierung des pAAV2.1-Rho-mCNGB1a-SV40 Vektors wurde der Maus Rhodopsin Promotor (Rho) (Flannery et al., 1997), das Simian Virus 40 (SV40) Polyadenylierungssignal (Schambach et al., 2007) und das Maus CNGB1a-Gen (mCNGB1a) mittels PCR amplifiziert. Als Polymerase diente die Herculase (Stratagene) auf Grund ihrer *proofreading*-Funktion, das heißt Synthesefehler, wie der Einbau einer falschen Base, werden behoben, was zu einer stark verminderten Fehlerrate führt. Alle PCR-amplifizierten Fragmente wurden sequenziert (Eurofins MWG Operon). Die verwendeten Primer wurden über die Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

Der Maus Rhodopsin Promotor (Rho) (464 bp) wurde aus genomischer DNA mit dem RhoF- und dem RhoR-Primer amplifiziert. Die Primer enthalten eine Restriktionsendonuklease-Schnittstelle (unterstrichene Sequenz) für AflIII (RhoF) bzw. SalI (RhoR).

RhoF: 5`-GATCCTTAAGATGTGGAGAAGTGAATTTAGGGCCCAA-3`

RhoR: 5`-GTATGTCGACCACTGCGGCTGCTCGAAGGGGCTCCGCA-3`

Für die Amplifikation des SV40 late poly A Fragments (SV40) (221 bp) wurde psi-Check-2 (Promega, Mannheim) als Template verwendet. Die Sequenz des SV40F-Primers enthält die Restriktionsendonuklease-Schnittstelle für NotI, die Sequenz des SV40R-Primers enthält die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen für XhoI.

SV40F: 5`-TGTAGCGGCCGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT-3`

SV40R: 5`-TGTACTCGAGTACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCT-3`

Das CNBB1a-Gen (3978 bp) wurde aus retinaler cDNA der Maus mit folgenden Primern, die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen für KpnI (RhoF) bzw. NotI (RhoR) enthalten, amplifiziert.

mB1F: 5`-CCGGTACCGCCACCATGTTGGGCTGGGTCCAAAGG-3`

mB1R: 5`-GATCGCGGCCGCTCATGCACCTCACTCCGCC-3`

### PCR-Ansatz für die Klonierung:

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| 1 µl     | <i>Forward</i> (F) Primer (10 µM)   |
| 1 µl     | <i>Reverse</i> (R) Primer (10 µM)   |
| 1 µl     | Desoxyribonucleotide (dNTPs, 10 mM) |
| 10 µl    | 5 x Herculase-Puffer (Stratagene)   |
| 100 ng   | Template                            |
| 0,5 µl   | Herculase (Stratagene)              |
| ad 50 µl | H <sub>2</sub> O                    |

Die Bedingungen jeder PCR-Reaktion (Elongationszeit, Temperatur der Primeranlagerung) wurden an das zu amplifizierende DNA-Stück sowie die verwendeten Primer angepasst.

### PCR-Protokoll für die Klonierung:

|                            |      |            |             |
|----------------------------|------|------------|-------------|
| (1) Initiale Denaturierung | 95°C | 60 sek     | } 35 Zyklen |
| (2) Denaturierung          | 95°C | 20 sek     |             |
| (3) Primeranlagerung       | X°C  | 20 sek     |             |
| (4) Elongation             | 72°C | 30 sek/ kb |             |
| (5) Finale Elongation      | 72°C | 5 min      |             |

## 4.2 Aufreinigung der DNA-Fragmente

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente mit dem PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach Zugabe des Lösepuffers (Verhältnis 3:1) und von Isopropanol (Verhältnis 1:1) zum PCR-Ansatz, wurde die Lösung auf eine Quick Gel Extraction Column aufgetragen und zentrifugiert (60 Sekunden, 1000 × g). Der Durchfluss wurde verworfen, die DNA war an das Säulenmaterial gebunden. Es folgte ein Waschschriff: Auf die Säule wurde 700 µl Waschpuffer gegeben, zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Zur vollständigen Entfernung des im Waschpuffer enthaltenen Ethanol wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Abschließend wurde das gewünschte DNA-Fragment mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

### 4.3 Plasmid pAAV2.1-mcs

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die extrachromosomal vorliegen und sich autosomal replizieren. Für die Klonierung wurde das Plasmid pAAV2.1-mcs verwendet, das durch Ersetzen der CMV-eGFP Sequenz in dem ursprünglichen Plasmid pAAV2.1-CMV-eGFP (Allocca et al., 2007) mit einem Linker (5'-GGCCGCACCGGTACCTGGTAACCTCTAGAGTCGACA-3') kloniert wurde (Michalakis et al., 2010). pAAV2.1-mcs verfügt über einen Replikationsursprung (origin of replication, ORI) und eine multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, mcs), welche die Erkennungssequenzen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen enthält. Außerdem weist es ein Ampicillin-Resistenzgen auf, mit dessen Hilfe Bakterien, die dieses Plasmid nach einer Transformation (siehe 4.6) aufgenommen haben, selektioniert werden können. Außerdem enthält das Plasmid die ITRs, welche die einzige virale Sequenz der rAAVs darstellen und das Verpackungssignal beinhalten.

### 4.4 Restriktion

Für die Restriktion wurden Enzyme von New England BioLabs (NEB) oder Fermentas verwendet. Die Wahl des Puffers erfolgte nach Herstellerangaben. Der Restriktionsansatz (3-5 µg DNA, 5 µl Puffer, 0,5 µl Enzym, ad 50 µl H<sub>2</sub>O) wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit der dreifachen Menge Solubilisationspuffer (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) versetzt und bei 55°C inkubiert, bis das Gel vollständig gelöst war. Die weitere Aufreinigung ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

### 4.5 Ligation

Nach der Restriktion erfolgte die Verknüpfung des Inserts mit dem Plasmid mittels des Rapid DNA Ligation Kits (Roche). Der Ligationsansatz (150 ng Insert, 50 ng Vektor, 2 µl DNA, Ligation Puffer und 0,5 µl Ligase) wurde 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 4.6 Transformation

Im Anschluss an die Ligation folgte die Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterienzellen mit dem Insert-Plasmid-Konstrukt. Es wurde ein 100 µl Aliquot des *E. coli*-Stamms  $\beta$ 10, das bei -80°C gelagert wird, auf Eis aufgetaut. Dann wurden 3 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad für 30 Sekunden und anschließend eine erneute Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Abschließend wurde die Zellsuspension auf ampicillinhaltigen Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### LB (+) Medium

|            |                    |
|------------|--------------------|
| 10 g       | Pepton             |
| 5 g        | Hefeextrakt        |
| 5 g        | NaCl               |
| 1 g        | Glucose            |
| ad 1 l     | ddH <sub>2</sub> O |
| pH 7,2-7,5 |                    |

##### LB (+) Agar

|            |               |
|------------|---------------|
| 15 g       | Agar          |
| ad 1 l     | LB (+) Medium |
| Ampicillin |               |

#### 4.7 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Nach erfolgreicher Ligation und Transformation konnten am nächsten Tag einzelne Kolonien von der Agar-Platte mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein Röhrchen mit 5 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB (+) Medium überführt werden. Diese Suspension wurde über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten, 1000 x g, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer gelöst und in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe des Lysepuffers (250 µl) und einer Inkubationszeit von fünf Minuten folgte der Neutralisationspuffer (250 µl) und eine weitere Inkubation von fünf Minuten. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (15 Minuten, 1000 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Fällung der DNA erfolgte mit 525 µl Isopropanol und einem Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 1000 x g, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 Minuten, 1000 x g, 4°C) und durch Vakuum-Zentrifugation getrocknet. Abschließend wurde

das Pellet in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung (Eurofins MWG Operon) bestätigt.

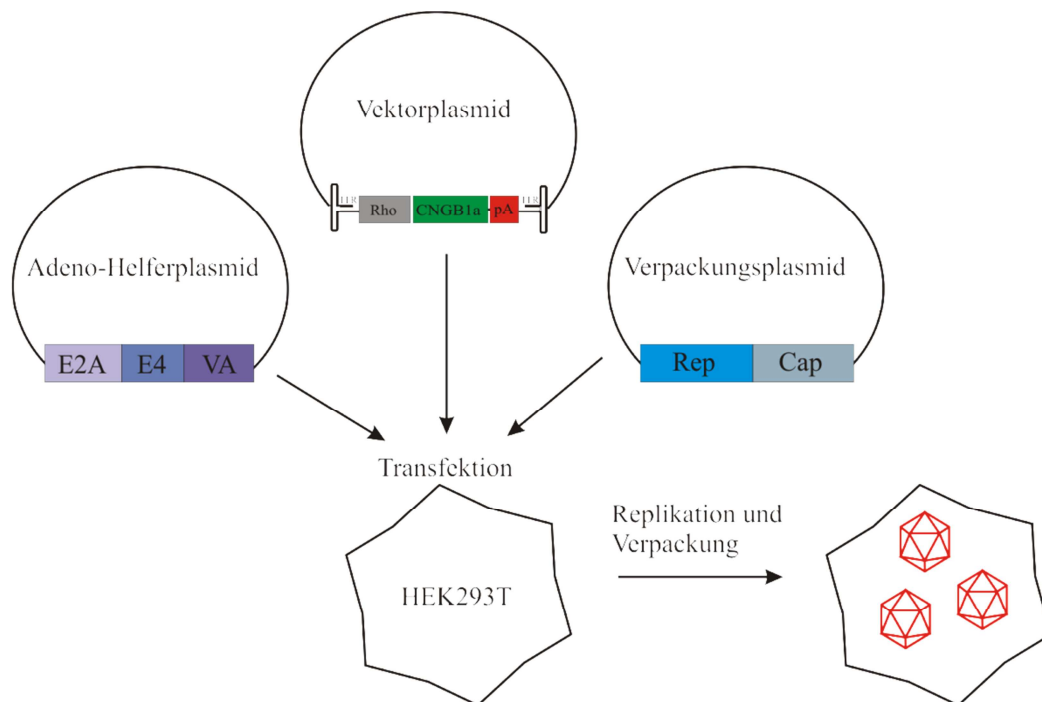
Für die Isolation größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde die Kolonie in einem Kolben mit 100 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ ml) LB (+) Medium angeimpft. Die weiteren Schritte erfolgten mittels des PureYield Plasmid Midiprep Systems (Promega) nach Herstellerangaben.

| <u>Resuspensionspuffer</u> |                  | <u>Lysepuffer</u> |                  | <u>Neutralisationspuffer</u> |                  |
|----------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| 6,06 g                     | Tris             | 8 g               | NaOH             | 294,5 g                      | Kalium-          |
| 3,72 g                     | EDTA             | 900 ml            | H <sub>2</sub> O |                              | acetat           |
| ad 1l                      | H <sub>2</sub> O | 100 ml            | 10% SDS          | ad 1l                        | H <sub>2</sub> O |
| 100 mg                     | RNase A          |                   |                  | pH 5,5                       |                  |
| pH 8                       |                  |                   |                  |                              |                  |

## 5 Herstellung des Rho-mCNGB1a rAAV-Vektors

### 5.1 Transfektion

Die Virusverpackung erfolgte in HEK293T-Zellen (DSMZ). HEK293T-Zellen wurden in DMEM + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I Medium (+ 4,5 g/l Glucose, - Pyruvate, + 10% FBS (Biochrom), + 1% Penicillin/ Streptomycin (Biochrom)) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von 70-80% verwendet. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das alte Medium durch frisches ersetzt. Es wurden 15 Platten (ø 150 mm) (Sarstedt) mittels der Calcium-Phosphat-Methode mit drei Plasmiden (Vektorplasmid, Adeno-Helferplasmid, Verpackungsplasmid) transfiziert (Abb. 10).



**Abb. 10: Verpackung des Rho-mCNGB1a rAAV-Vektors.** Das Vektorplasmid kodiert die Expressionskassette (Rho-mCNGB1a-pA), die von den viralen Verpackungssignalen (inverted terminal repeats, ITRs) flankiert ist. Das Rep- und das Cap-Gen werden von einem Helferplasmid bereitgestellt. Die adenoviralen Gene (E2A, E4 und VA), die für die Herstellung der rAAV-Vektoren notwendig sind, werden von einem Adeno-Helferplasmid kodiert. Nach der Transfektion mit diesen drei Plasmiden beginnt die Replikation und Verpackung in den HEK293T-Zellen.

### Transfektionsansatz:

|            |   |
|------------|---|
| 270 µg     | pAAV2.1-Rho-mCNG1a-SV40   |
| 525 µg     | Adeno-Helferplasmid, das die essentiellen adenoviralen Helfer-Gene (E2A, E4, VA) kodiert* |
| 250 µg     | Verpackungsplasmid, welches das Rep-Gen von AAV-2 und das Cap-Gen von AAV-8 kodiert**     |
| 1,75 ml    | CaCl <sub>2</sub> (2,5M)  |
| 17,5 µl    | Polybrene (Hexadimethrin Bromid) (8 mg/ ml) (Sigma)                                       |
| 1750 µl    | Dextran 500 <i>from Leuconostoc spp.</i> (10 mg/ml) (Sigma)                               |
| ad 17,5 ml | H <sub>2</sub> O  |

\* Die Menge des Adeno-Helferplasmids berechnet man nach folgender Formel:  
$$270 \text{ µg} / \text{Molekulargewicht des AAV-Plasmids} \times \text{Molekulargewicht des Adeno-Helferplasmids}$$

\*\* Die Menge des Verpackungsplasmids berechnet man nach folgender Formel:  
$$270 \text{ µg} / \text{Molekulargewicht des AAV-Plasmids} \times \text{Molekulargewicht des Verpackungsplasmids}$$

Die Zugabe von Dextran 500 und Polybrene erhöht die Effizienz der Calcium-Phosphat-Transfektion signifikant (Wu and Lu, 2007).

Der Transfektionsansatz wurde geschüttelt und tropfenweise mit 17,5 ml 2 x BBS versehen. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden je 2,3 ml des Transfektionsansatzes auf die 15 Platten gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 3-5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert.

### 2 x BBS

10,65 g      BES (Sigma)  
16,35 g      NaCl  
0,21 g      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O  
ad 950 ml    H<sub>2</sub>O  
pH = 6,95  
ad 1 l        H<sub>2</sub>O  
steril filtrieren

## **5.2    Ernte**

Die Zellen wurden durch Abschaben mit einem Zell-Heber (VWR) geerntet und bei 3000 x g für 15 Minuten zentrifugiert (Rotor JA-10, Beckman Coulter). Das Pellet wurde in 7,5 ml Lysepuffer resuspendiert, je drei Mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach dem letzten Einfrierschritt wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

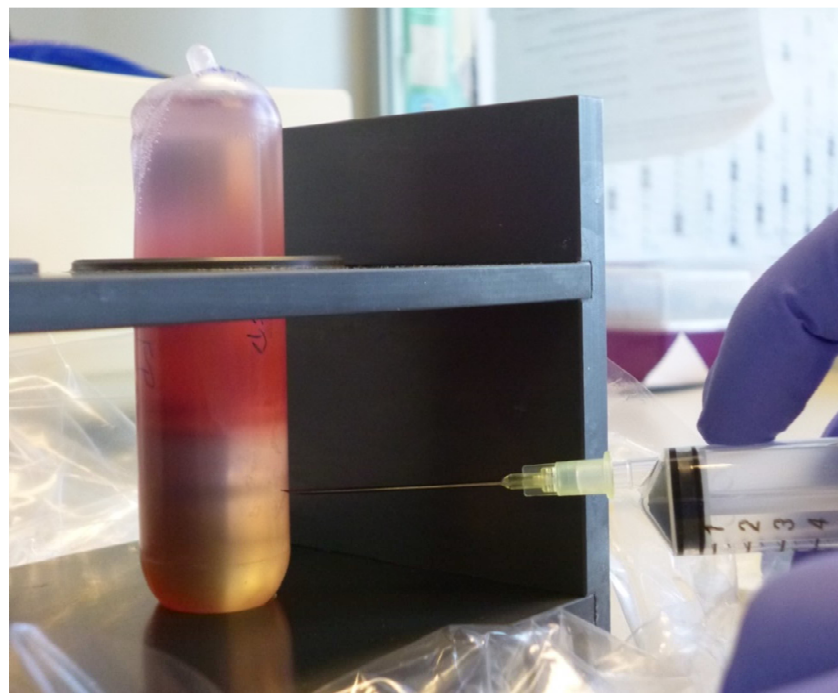
### Lysepuffer

150 mM      NaCl  
50 mM        Tris-HCl, pH 8,5  
steril filtrieren



### 5.3 Aufreinigung der rAAV-Vektoren über einen Iodixanol-Gradienten

Die virushaltige Präparation wurde aufgetaut, mit Benzonase (50U/ ml) (VWR) versetzt und bei 37°C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (25 Minuten, 3700 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen (Beckman Quickseal Polyallomer, Beckman Coulter) überführt und mit 15% Iodixanol (7 ml), 25% Iodixanol (5 ml), 40% Iodixanol (5 ml) und 60% Iodixanol (6 ml) unterschichtet (Grieger et al., 2006). Zum Unterschichten diente eine sterile Glaspipette mit langem Hals und eine Schlauchpumpe (Minipuls 3, Gilson). Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend mit einem Tube Topper (Beckman Coulter) versiegelt und für 105 Minuten bei 70 000 rpm und 18°C ultrazentrifugiert (Rotor 70 Ti, Sorvall Discovery 90, Thermo Scientific). Abschließend konnte man die virushaltige 40%-Phase entnehmen: Zum Druckausgleich wurde zuerst eine Kanüle oben ins Röhrchen eingestochen, dann wurde mit einer Kanüle an der unteren Grenze der 40%-Phase eingestochen und die Lösung bis unmittelbar unterhalb der 25%-Phase mit einer Spritze entnommen (Abb. 11). Die 40%-Phase wurde bei -80°C weggefroren.



**Abb. 11: Entnahme der virushaltigen 40%igen Iodixanol-Phase mit einer Spritze.** Nach der Zentrifugation befinden sich die viralen Vektoren in der 40%igen Iodixanol-Phase. Die Phasen lassen sich anhand der Farben unterscheiden.

|                      |          |       |                   |
|----------------------|----------|-------|-------------------|
| <u>15% Iodixanol</u> |          | 1 M   | MgCl <sub>2</sub> |
|                      |          | 2,5 M | KCl               |
| 5 ml                 | 10 x PBS | 5 M   | NaCl              |

## Material und Methoden

---

|                      |                   |          |                   |
|----------------------|-------------------|----------|-------------------|
| 12,5 ml              | Optiprep (Progen) | 1 M      | MgCl <sub>2</sub> |
| 1%                   | Phenolrot         | 2,5 M    | KCl               |
| ad 50 ml             | H <sub>2</sub> O  | 20,9 ml  | Optiprep (Progen) |
|                      |                   | 1%       | Phenolrot         |
| <u>25% Iodixanol</u> |                   | ad 50 ml | H <sub>2</sub> O  |

5 ml            10 x PBS

### 40% Iodixanol

5 ml            10 x PBS  
1 M            MgCl<sub>2</sub>  
2,5 M          KCl  
5 M            NaCl  
33,3 ml       Optiprep (Progen)  
ad 50 ml       H<sub>2</sub>O

### 60% Iodixanol

1 M            MgCl<sub>2</sub>  
2,5 M          KCl  
1 M            NaCl  
50 ml          Optiprep (Progen)  
1%            Phenolrot

## 5.4    Aufreinigung der rAAV-Vektoren mittels Anionenaustauschchromatographie

Für eine weitere Aufreinigung der rAAV-Vektoren sorgte eine Anionenaustauschchromatographie mittels der ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Mit Hilfe dieses Verfahrens

lassen sich Stoffe auf Grund ihrer Ladung trennen. Auf der Anionenaustauschsäule (HiTrap TM Q FF, GE Healthcare) erfolgte die chromatographische Trennung der Probe. Zuerst wurde die Säule mit dem Puffer A equilibriert, dann der Virus im Verhältnis 1:1 mit dem Puffer A verdünnt und mittels eines Schleifeninjektors auf die Säule geladen. Dem Beladen der Säule folgte die Elution der gebundenen Moleküle durch Zugabe von 2,5 M NaCl bei einer Flussrate von 10 ml/min. Anhand der aufgezeichneten Leitfähigkeiten der von der Säule kommenden Flüssigkeiten wurden dann die geeigneten Fraktionen vereinigt.

### Puffer A

|           |                  |
|-----------|------------------|
| 20 mM     | Tris             |
| 15 mM     | NaCl             |
| ad 500 ml | H <sub>2</sub> O |
| pH 8,5    |                  |

## **5.5 Konzentrierung und Umsalzung der rAAV-Vektoren**

Zur Erhöhung der Konzentration der rAAV-Vektoren wurden die vereinigten Fraktionen auf eine Amicon-Säule (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units, 100 kDa, Millipore) gegeben und mehrmals zentrifugiert (3400 x g, Rotor J2-MC, Beckman&Coulter Zentrifuge), bis das Volumen auf etwa 500 µl eingengt war. Ein weiterer Aufreinigungsschritt erfolgte durch die Zugabe von Tween/PBS-MK (1 ml) und eine erneute Zentrifugation, bis das Volumen auf etwa 100 µl eingengt war. Die im Filter enthaltene rAAV-Suspension, die auf Grund ihrer molekularen Masse die Poren des Filters nicht passieren konnte, wurde abschließend aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### Tween/PBS-MK

|      |                   |
|------|-------------------|
| 10%  | 10 x PBS          |
| 1 mM | MgCl <sub>2</sub> |

|        |          |
|--------|----------|
| 2,5 mM | KCl      |
| 0,014% | Tween-20 |

## 5.6 rAAV-Titerbestimmung mittels quantitativer real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) ermöglicht die Bestimmung des genomischen Titors der Virussuspension. Voraussetzung für die Berechnung des genomischen Titors ist eine Standardkurve, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines CNGB1-Fragments erstellt wurde. Das CNGB1-Fragment (107 bp) wurde mittels PCR mit folgenden Primern amplifiziert:

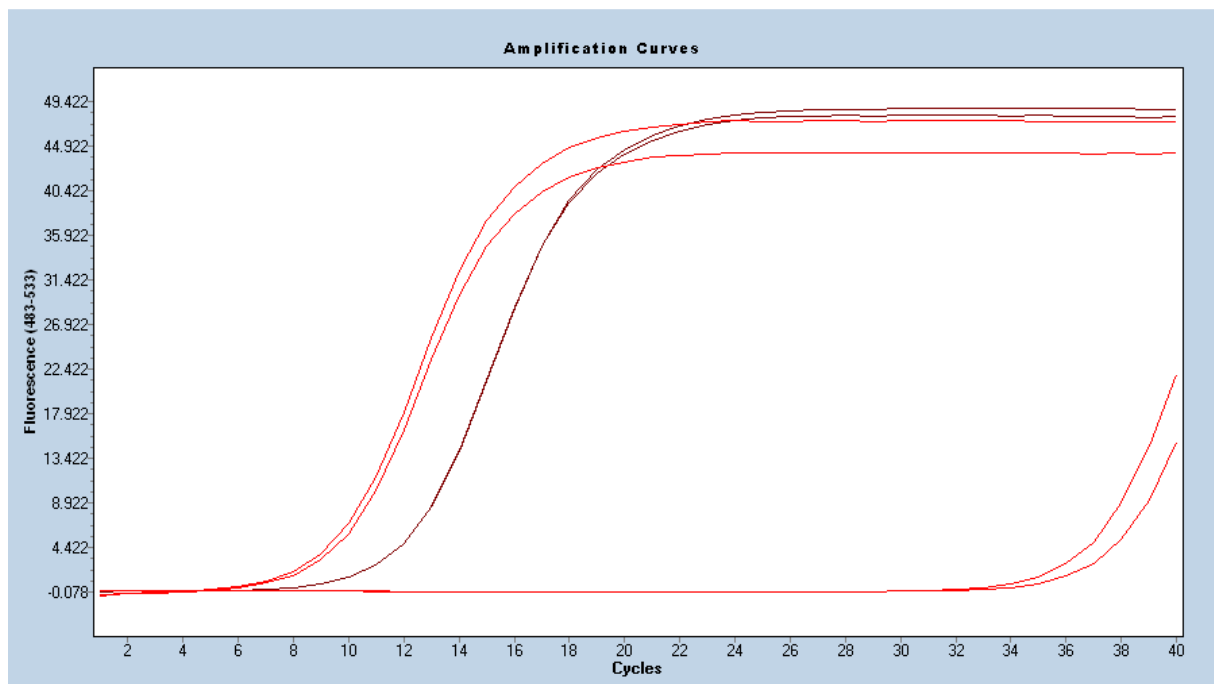
rB1aqF: 5'-GAACTGGAAGCTGGCTGAT-3'

rB1aqR: 5'-TGGAACACGGTGATGTCCAGGA

Nach der Amplifikation folgte die Aufreinigung (siehe Kapitel 4.2 ) und die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Nanodrops ND-1000 (Peqlab) des PCR-Fragments. Anhand der bestimmten Konzentration ließ sich die Genom-Kopienzahl nach folgender Formel berechnen:  $\text{Kopienzahl} = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ (Avogadro-Konstante)} \cdot m_{\text{gemessen}}[\text{g}] / \text{Molekulargewicht der ds DNA}$

Anschließend wurde eine acht Logstufen umfassende Verdünnungsreihe erstellt. Die erste Verdünnungsstufe enthält  $1 \cdot 10^{11}$  Kopien/  $\mu\text{l}$ , die letzte  $1 \cdot 10^4$  Kopien/  $\mu\text{l}$ . Jede Verdünnungsstufe wurde dann mittels qPCR in einem Light Cycler LC480 (Roche) im zweifachen Ansatz amplifiziert und mit Hilfe der Fluoreszenz von SYBR Green I (Roche) vermessen. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green lagert sich in die DNA ein; die Fluoreszenz wird für jede Probe während jedes PCR-Zyklus gemessen. Aus diesen Messungen wurde mit der LightCycler-Software LC-Run (Version 5.32, Roche) eine Fluoreszenzkurve erstellt, welche die Zahl der PCR-Zyklen zur jeweils gemessenen Fluoreszenz in Beziehung setzt und die Cp (Crossing points)-Werte berechnet. Der Cp-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Standardkurve wird nun durch Auftragen des Logarithmus der einzelnen Verdünnungsstufen gegen den Cp-Wert konstruiert.

Die aufgereinigten und konzentrierten rAAV-Vektoren wurden 1:500 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, im zweifachen Ansatz amplifiziert, die Fluoreszenz durch den LightCycler (Roche) gemessen und eine Fluoreszenzkurve erstellt (Abb. 12). Zur Berechnung des genomischen Titors setzte die LC Software die Cp-Werte der Rho-CNGB1a rAAVs in Beziehung zur Standardkurve.



**Abb. 12: Fluoreszenzkurve.** Die Fluoreszenzkurve zeigt den Anstieg der SYBR-Green-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom PCR-Verlauf. Mit der dunkelroten Linie wurde die Verdünnungsstufe  $1 \cdot 10^8$  (Standard) dargestellt. Die hintere rote Linie zeigt die Negativkontrolle (Wasser als Template). Die vordere rote Linie gibt die Messung der Rho-CNGB1a Viruspräparation wieder.

#### Quantitativer real-time PCR-Ansatz:

|               |  |
|---------------|--|
| 1 $\mu$ l     | rB1aqF (10 $\mu$ M)                              |
| 1 $\mu$ l     | rB1aqR (10 $\mu$ M)                              |
| 10 $\mu$ l    | SYBR Green I Master (Roche) Desoxyribonucleotide |
| 5 $\mu$ l     | Template   |
| ad 20 $\mu$ l | H <sub>2</sub> O                                 |

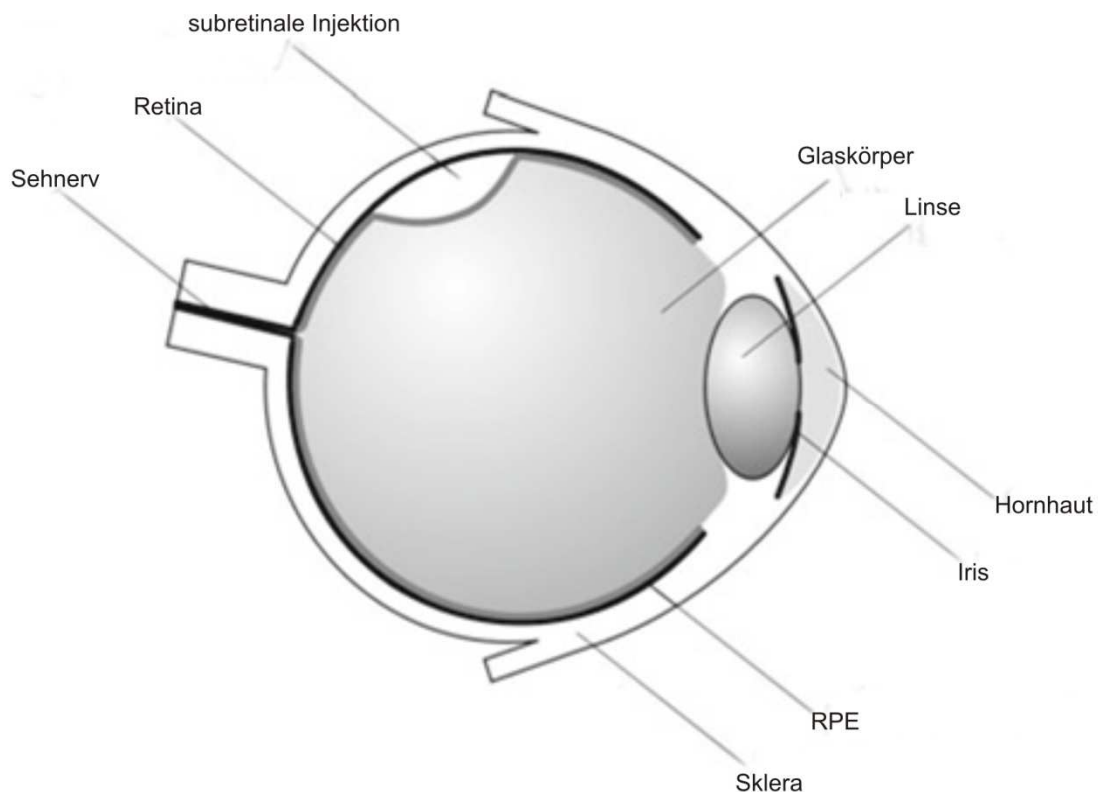
#### Quantitative real-time PCR-Protokoll:

|                            |      |        |   |
|----------------------------|------|--------|---|
| (1) Initiale Denaturierung | 95°C | 10 min | } |
| (2) Denaturierung          | 95°C | 10 sek |   |

|                       |      |        |           |
|-----------------------|------|--------|-----------|
| (3) Primeranlagerung  | 60°C | 5 sek  | 40 Zyklen |
| (4) Elongation        | 72°C | 20 sek |           |
| (5) Finale Elongation | 72°C | 5 min  |           |

## 6 Subretinale Injektion

Die subretinalen Injektionen führte Frau Dr. Mühlfriedel (AG Neurodegeneration des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Universität Tübingen) durch (Michalakis et al., 2010; Mühlfriedel et al., 2013). 14 Tage alte CNGB1-defiziente Mäuse wurden durch eine subkutane Injektion von Ketamin (66,7 mg/kg) und Xylazin (11,7 mg/kg) betäubt und die Pupillen durch Tropicamid-haltige Augentropfen (Mydriaticum Stulln, Pharma Stulln GmbH, Deutschland) erweitert. 1  $\mu$ l der Rho-CNGB1a rAAV-Partikel (Titer:  $2,62 \cdot 10^{11}$  genomische Partikel/ $\mu$ l) wurden mit einer geschliffenen Kanüle (34 Gauge, WPI) auf einer Glasspritze (WPI Nanofil syringe 10  $\mu$ l, World Precision Instruments, Berlin) subretinal injiziert (Abb. 13), und zwar frei Hand unter einem Operationsmikroskop (OPMI 1FR-Pro, Carl Zeiss, Oberkochen); danach folgte die Überprüfung *in vivo* mit der konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskopie (cSLO) (Seeliger et al., 2005) und der optischen Kohärenztomografie (Fischer et al., 2009). Etwa eine von fünf injizierten Mäusen wurde von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, weil die subretinale Injektion nicht optimal war.



**Abb. 13: Schematische Darstellung einer subretinalen Injektion.** Durch die subretinale Injektion der rAAV-Partikel kommt es zu einer lokalen und temporären Abhebung der Netzhaut. Modifiziert nach (Mühlfriedel et al., 2013).

## 7 Western Blot

### 7.1 Proteinisolation aus Retina-Gewebe

Die Retina wurde mittels der Winklertechnik entnommen, anschließend in Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis mit einem Mörser zermahlen. Das pulverisierte Gewebe der Netzhaut wurde in 40 µl Lysepuffer (2 % SDS, 50 mM TRIS und Proteinase-Inhibitoren) aufgenommen, für 15 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend abzentrifugiert (10 Minuten, 16000 × g, 4°C). Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 7.2 SDS-Page und Western Blot

Die Protein-Lysate wurden mit 6 x Lämmli-Puffer + DTT versetzt und bei 72°C für 15 Minuten inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Danach ließen sich die Proteine in einer Elektrophoreseapparatur (Protean 3, Biorad) bei 100 V mittels eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gels nach ihrer Größe auftrennen. Als Größenstandard diente der Benchmark Protein Ladder (Invitrogen). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit einem Tank-Blot-System (Mini Trans Blot, Biorad) auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte in vorgekühltem Transferpuffer für 90 Minuten bei 100 V. Anschließend wurde die Membran, die kurz in Methanol äquilibriert wurde, für eine Stunde in 5% Milchpulver geschwenkt. Es folgte die Inkubation des Primärantikörpers in 3% Milchpulver bei 4°C über Nacht. Zur Verwendung kamen folgende Primärantikörper (Tabelle 2):

**Tabelle 2: Liste der primären Antikörper, die im Western Blot verwendet wurden**

| Antikörper   | Wirtsspezies | Verdünnung | Quelle                 |
|--------------|--------------|------------|------------------------|
| CNGB1 (1B4)  | Maus         | 1:30       | (Poetsch et al., 2001) |
| CNGA1 (2G11) | Maus         | 1:30       | (Molday et al., 1991)  |
| Tubulin      | Maus         | 1:2000     | Dianova, Hamburg       |



Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem folgenden Sekundärantikörper in 3% Milchpulver für eine Stunde geschwenkt (Tabelle 3):

**Tabelle 3: Liste des sekundären Antikörpers, der im Western Blot verwendet wurde**

| Antikörper          | Wirtsspezies | Verdünnung | Quelle                 |
|---------------------|--------------|------------|------------------------|
| $\alpha$ -Mouse HRP | Schaf        | 1:2000     | GE Healthcare, München |

Nach drei Waschschritten in TBST und einem Waschschritt in doppelt destilliertem Wasser wurden die Antikörper durch Chemilumineszenz mit Hilfe des Western Blotting Luminol Reagent-Kits (Santa Cruz) detektiert. Die Filme zur Detektion der Chemilumineszenz (Hyperfilm ECL, Amersham) wurden mit einer Filmentwicklermaschine (Curix 60, Agfa) entwickelt.

### 10 x TBS

12,1 g      Tris-HCl  
80,2 g      NaCl  
ad 1 l      H<sub>2</sub>O

### 1 x TBST

100 ml      10 x TBS  
1 ml      Tween-20  
ad 1 l      H<sub>2</sub>O

### 6 x Lämmli-Puffer + DTT

7 ml      4 x Tris-HCL/SDS pH6,8  
3 ml      Glycerol  
1 g      SDS  
1,2 mg      Bromphenolblau  
ad 10 ml      H<sub>2</sub>O

### 10x Elektrophoresepuffer

30,2 g      Tris  
144 g      Glycin  
10g      SDS  
Ad 1 l      H<sub>2</sub>O

### Sammelgelpuffer

0,5 M      Tris-HCl  
0,4%      SDS  
pH 6,8

### Trenngelpuffer

1,5 M      Tris-HCl  
0,4%      SDS  
pH 8,8

### Sammelgel

0,65 ml      30% Acrylamid/  
                 0,8% Bisacrylamid  
1,25 ml      Sammelgelpuffer  
3,05 ml      H<sub>2</sub>O  
25 µl        20% Ammoniumpersulfat  
5 µl         TEMED

### 10%-Trenngel

5,0 ml      30% Acrylamid/  
                 0,8% Bisacrylamid  
3,75 ml      Trenngelpuffer  
6,25 ml      H<sub>2</sub>O  
30 µl        20% Ammoniumpersulfat  
10 µl        TEMED

### Transferpuffer

24,8 mM    Tris-Base  
191,8 mM   Glycin  
Ad 800 ml   H<sub>2</sub>O  
Ad 1 l        Methanol

## **8 Elektroretinogramm**

Das Elektroretinogramm (ERG) ist ein diagnostisches Hilfsmittel zur Untersuchung der Netzhautfunktion. Die Messungen erfolgten im Arbeitskreis von Prof. Dr. Seeliger in Tübingen mit Hilfe von Ganzfeld-Elektroretinogrammen (Seeliger et al., 2001a; Tanimoto et al., 2009). Die Mäuse wurden vor den Messungen über Nacht (mindestens 12 Stunden) dunkeladaptiert und anschließend durch eine subkutane Injektion von Ketamin (66,7 mg/kg) und Xylazin (11,7 mg/kg) betäubt, die Pupillen durch Tropicamid-haltige Augentropfen (Mydriaticum Stulln, Pharma Stulln GmbH) erweitert. Kreisförmige Elektroden wurden auf die Hornhaut gesetzt, zwei Referenzelektroden an der Stirn und am Rücken befestigt. Die von der Netzhaut gebildeten elektrischen Potenziale wurden bei steigenden Lichtblitzintensitäten von  $10^{-4}$  cds/m<sup>2</sup> bis 25 cds/m<sup>2</sup> gemessen.

## 9 Immunhistochemie

### 9.1 Präparation der Retina

Um die Orientierung der Retina bis zu den Gefrierschnitten zu verfolgen, wurde auf dem Augapfel der toten Maus mit einer glühenden Nadel temporal eine Markierung eingebrannt. Anschließend wurde das Auge entnommen, an der ora serrata mit einer 0,8 mm Kanüle eingestochen und fünf Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA) auf Eis vorfixiert. Dann wurde unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) am oberen Rand der ora serrata mit einer Mikroaugenschere (Mini Vanas, Schnittfläche 3 mm, Frohnhäuser) entlang geschnitten; die eingebrannte Markierung wurde mit einem kleinen Schnitt in die Retina umgesetzt. Nach Entfernung der Kornea, der Linse und des Glaskörpers wurde die im Augenbecher verbliebene Retina für 45 Minuten in 4% PFA auf Eis immersionsfixiert. Anschließend wurde der Augenbecher dreimal in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) gewaschen und über Nacht in 30% Saccharose kryoprotektiert. Abschließend wurde der Augenbecher in Tissue freezing medium (Electron Microscopy Sciences) eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 0,1 M PB

28,48 g      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 5,52 g      NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
 ad 2 l      H<sub>2</sub>O  
 pH 7,4

#### 4% PFA

6 g      Paraformaldehyd (Merck)  
 ad 150 ml      0,1 M PB  
 bei 60°C lösen  
 steril filtrieren  
 bei -20°C lagern

### 9.2 Anfertigung von Kryo-Gewebeschnitten

Das in Tissue freezing medium eingebettete Gewebe wurde mit einem Kryostat (Leica CM3050 S, Leica Biosystems) in einer Dicke von 10 µm geschnitten und auf Glas-Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel) geschmolzen. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

### 9.3 Immunhistochemie

Nach dem Auftauen und Trocknen der Kryo-Gewebeschnitte wurden diese mit einem PapPen Liquid Blocker (Science Services) umrandet. Die Retinae wurden mit 0,1 M PB rehydriert und anschließend für 10 Minuten mit 4% PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit 0,1 M PB erfolgte die Inkubation der Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 0,1 M PB, 5% Chemiblocker (Millipore) und 0,3% Triton X-100. Folgende Primärantikörper wurden verwendet (Tabelle 4):

**Tabelle 4: Liste der primären Antikörper, die in der Immunhistochemie verwendet wurden**

| Antikörper            | Wirtsspezies | Verdünnung | Quelle   |
|-----------------------|--------------|------------|--|
| CNGB1 (C-Abm)         | Kaninchen    | 1:30 000   | (Hüttl et al., 2005)                               |
| CNGA1 (2G11)          | Maus         | 1:30       | (Molday et al., 1991)                              |
| Peripherin-2 (Per5H2) | Maus         | 1:1000     | (Connell et al., 1991)                             |
| cGMP                  | Schaf        | 1:3000     | (Tanaka et al., 1997)                              |
| Cy3-anti-GFAP         | Maus         | 1:1000     | Sigma-Aldrich, #C9205<br>(Michalakis et al., 2005) |
| Zapfen Arrestin       | Kaninchen    | 1:300      | (Zhang et al., 2012)                               |

Vor der Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die Schnitte erneut dreimal mit 0,1 M PB gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden in 0,1 M PB mit 3% Chemiblocker verdünnt und für 90 Minuten inkubiert (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Liste der sekundären Antikörper, die in der Immunhistochemie verwendet wurden**

| <b>Antikörper</b>        | <b>Wirtsspezies</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Quelle</b>                         |
|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Cy3-anti-Kaninchen       | Esel                | 1:400             | Jackson Laboratories,<br>#705-166-147 |
| Alexa488-anti-Maus       | Ziege               | 1:800             | Cell Signaling Technologies,<br>#4408 |
| Cy2-anti-Schaf           | Esel                | 1:200             | Jackson Laboratories,<br>#713-225-147 |
| Cy2-anti-Meerschweinchen | Esel                | 1:200             | Jackson Laboratories,<br>#106-225-003 |

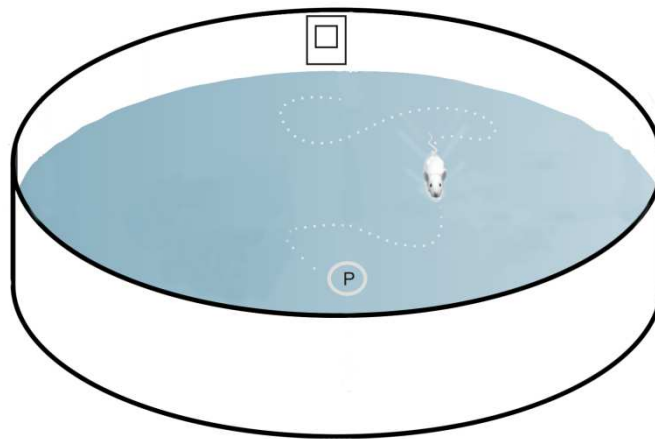
Es folgte erneutes dreimaliges Waschen der Schnitte in 0,1 M PB. Die Zellkerne wurden mit dem Zellkernmarker Höchst 33342 (5 µg/ml, Invitrogen) für fünf Minuten gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit 0,1 M PB gewaschen und mit dem wässrigen Fluoreszenzeindeckungsmittel Fluoromount-G (Beckman Coulter) eingedeckelt.

#### **9.4 Mikroskopie**

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss), das mit vier Lasern ausgestattet ist: UV (351 nm), Argon2 (488 nm), HeNe/1 (543 nm), HeNe/2 (633 nm). Die Bilder wurden als Schnittserie aus drei Scans (Z-Stack) aufgenommen, die für die Visualisierung mittels der Zeiss LSM Software wieder auf eine Ebene kollabiert wurden.

## 10 Das Morris Water Maze als Sehtest

Das Morris Water Maze zielt ursprünglich auf die Untersuchung des räumlichen Lernens (Morris, 1984), kann aber auch zu einem Sehtest modifiziert werden (Michalakis et al., 2010; Pang et al., 2006). Für die Verhaltensversuche wurden die Mäuse einzeln in einem inversen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten, das Experiment wurde in der dunklen Phase durchgeführt. Die Versuchsanordnung bestand aus einem runden Becken (120 cm im Durchmesser, 70 cm hoch, weißes Plastik) (TSE Systems, Bad Homburg), das mit Wasser (21°C) gefüllt und am Beckenrand mit ausgeprägten Markierungen (Quadrat, Dreieck, Kreis) versehen war. Im Becken befand sich eine Plattform aus durchsichtigem Plexiglas (10 cm im Durchmesser), deren Position nicht verändert wurde (Abb. 14).



**Abb. 14: Morris Water Maze zur Durchführung eines Sehtests.** Die Versuchsanordnung besteht aus einem runden Becken (Ø 120 cm), das mit Wasser (21°C) gefüllt und am Beckenrand mit Markierungen versehen ist. Eine Plattform (P) (Ø 10 cm), welche über die Versuchsdauer an konstanter Stelle bleibt, dient als Fluchtposition für die Mäuse.

Die Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen unter dunklen Lichtbedingungen ( $0,32 \text{ cd/m}^2$ ) trainiert, die Plattform zu finden. Die Beleuchtungsverhältnisse wurden mit einem Belichtungsmesser (Minolta Spotmeter M) gemessen. Da Mäuse sehr wasserscheu sind, weist die Aufgabe einen hohen Motivationsfaktor auf. An jedem Tag fanden acht Durchgänge statt, wobei sich die Startposition der Maus nach jedem Durchgang änderte. Ein Durchgang war beendet, sobald die Maus die Plattform erklommen hatte. Hatte die Maus diese nach zwei Minuten nicht gefunden, setzte man sie auf die Plattform. Nach 10 Sekunden auf der Plattform wurde die Maus unter einer Wärmelampe getrocknet und anschließend in ihren Käfig zurückgebracht. Über dem Becken befand sich eine Infrarotlichtkamera, welche Softwaregestützt (VideoMot2, TSE Systems, Bad Homburg) anhand von Kontrastwerten die Maus im

Water Maze identifizierte und die Bewegungsmuster aufzeichnete. Anschließend konnte man die Schwimmstrecke, -geschwindigkeit und die benötigte Zeit bis zum Finden der Plattform auswerten. Das Experiment zielte darauf ab, dass die Mäuse anhand visueller Landmarken die Plattform finden. Auf Grund der dunklen Lichtbedingungen wurde dadurch indirekt die Funktionsfähigkeit der Stäbchen getestet. An zwei weiteren Tagen wurde der gleiche Versuch unter hellen Lichtbedingungen ( $29,04 \text{ cd/m}^2$ ) durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit der Zapfen zu überprüfen. Während des Experiments war nicht bekannt, welchen Genotyp die Maus hat, und ob diese therapiert oder untherapiert ist.



## 11 Datenanalyse

Alle Ergebniswerte wurden als Mittelwerte angegeben; n steht für die Anzahl der Experimente. Bei der statistischen Auswertung der Water Maze-Versuche wurden die drei Gruppen (Wildtyp, therapierte und untherapierte CNGB1-defiziente Mäuse) anhand einer Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) miteinander verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism™ Version 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) und Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Messwerte galten als statistisch signifikant bei  $p < 0,05$ .

## IV Ergebnisse

### 1 Design, Produktion und Injektion des Rho-CNGB1a AAV-Vektors

Für die Therapie von CNGB1-defizienten Mäusen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Gentransfer mit Hilfe von rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV)-Vektoren durchgeführt. Für die Herstellung der rAAV-Vektoren wurde die Expressionskassette, bestehend aus dem Transgen und den DNA-Abschnitten außerhalb der Protein-kodierenden Sequenz (Promotor, Enhancer, Terminator), zwischen die inverted terminal repeats (ITRs) des Serotyps 2 kloniert. Beim Vektordesign gilt es die geringe Verpackungskapazität der rAAV-Vektoren zu berücksichtigen, das heißt die Expressionskassette darf nicht größer als 5,2 kb sein (Dong et al., 2010; Lai et al., 2010; Wu et al., 2010).

Als Plasmidvektor diente pAAV2.1-mcs, das eine multiple Klonierungsstelle und zwei ITRs enthält (Michalakakis et al., 2010). Die ITRs (je 145 bp) stellen die einzig erforderlichen viralen cis-Elemente für die Vektor-Konstruktion dar und flankieren die Expressionskassette (Rabinowitz and Samulski, 1998) (Abb. 15). Die Expressionskassette besteht aus der murinen CNGB1a cDNA (3978 bp), die unter Kontrolle des Maus-Rhodopsin-Promotors (471 bp) in das Plasmid kloniert wurde. Der verwendete Rhodopsin-Promotor ermöglicht eine spezifische und effiziente Expression von Transgenen in Fotorezeptoren (Flannery et al., 1997). Als post-transkriptionelles Element wurde hinter das CNGB1a Gen die SV40 Polyadenylierungssequenz (221 bp) kloniert, die als effektiver Terminations- und Polyadenylierungs-Enhancer wirkt (Schambach et al., 2007). Dieses Vektor-Konstrukt hat eine Größe von 5,1 kb und überschreitet somit die Verpackungskapazität von rAAV-Vektoren nicht.



**Abb. 15: Expressionskassette des Rho-CNGB1a AAV-Vektors.** Die Expressionskassette besteht aus dem Maus-Rhodopsin-Promotor (471 bp) (Rho), der CNGB1a cDNA (3978 bp) sowie der SV40 polyA Sequenz (221 bp) und ist von den beiden inverted terminal repeats (ITRs) (je 145 bp) flankiert.

Um eine effektive Transduktion der Fotorezeptoren zu erreichen, wurde das Konstrukt in ein Y733F-modifiziertes AAV8-Kapsid verpackt (Peters-Silva et al., 2009). Nach Aufreinigung der viralen Vektoren wurde mittels qPCR der Titer von  $2,62 \cdot 10^{11}$  genomischen Partikeln/  $\mu\text{l}$  bestimmt.

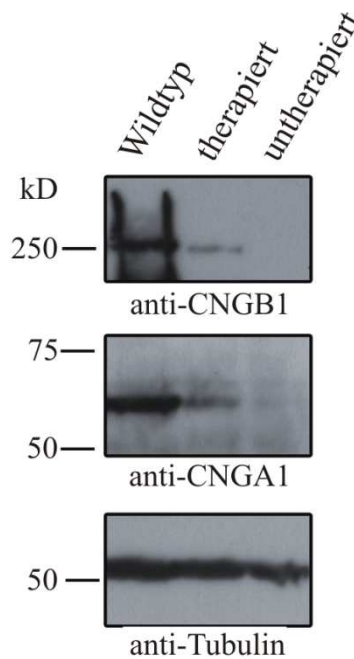
Die subretinale Injektion führte Frau Dr. Mühlfriedel (AG Neurodegeneration des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Universität Tübingen) durch. Es wurde 1  $\mu\text{l}$  der Rho-CNGB1a AAV-Vektoren bei 14 Tagen alten CNGB1-defizienten Mäusen subretinal in das rechte Auge injiziert. Im Anschluss an die Injektion überprüfte man *in vivo* mit der konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskopie (Seeliger et al., 2005) und der optischen Kohärenztomografie (OCT) (Fischer et al., 2009) die durch die Injektion entstandene Abhebung (Abb. 16). Das linke Auge wurde nicht behandelt und diente als Kontrolle.



**Abb. 16: Repräsentativer Scan der Netzhaut nach der der subretinalen Injektion mittels optischer Kohärenztomografie (OCT).** Im OCT-Scan sind die Injektionsstelle (Pfeil) und eine lokale Abhebung der Netzhaut erkennbar, die sich nach wenigen Tagen zurückbildet. Der Maßstabsbalken markiert 200  $\mu\text{m}$ . GC/IPL, Ganglienzellschicht/ innere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; ONL, äußere Körnerschicht; I/OS, Innen- und Außensegment; RPE/CC, retinales Pigmentepithel/ Choriocapillaris.

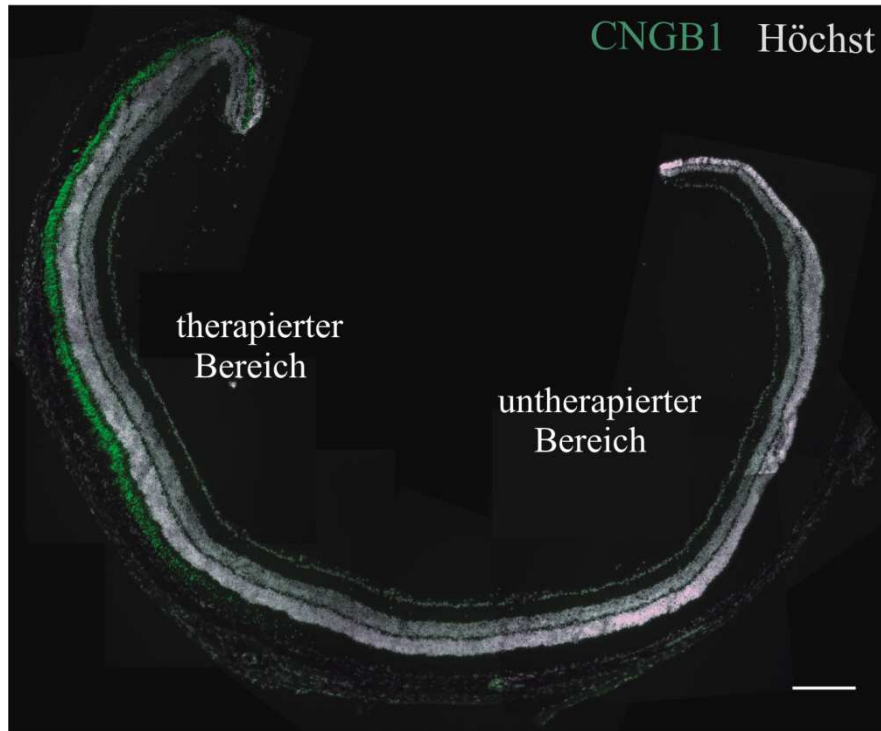
## 2 Biochemische und histologische Untersuchungen der Genexpression

Nach erfolgreicher subretinaler Injektion wurde zunächst untersucht, ob die eingeschleuste CNGB1a-cDNA abgelesen und das Protein produziert wird. In Western Blot-Analysen zeigte sich, dass das ca. 250 kDa große CNGB1-Protein in der injizierten Retina einer CNGB1-defizienten Maus exprimiert wird. In der untherapierten Retina war dagegen keine Bande zu detektieren (Abb. 17, oberes Panel). Auch das 63 kDa große CNGA1-Protein, das in der untherapierten CNGB1-defizienten Maus herunterreguliert ist und im Western Blot dementsprechend nicht detektierbar war, konnte in der therapierten Retina nachgewiesen werden (Abb. 17, mittleres Panel). In der Retina einer Wildtyp-Maus sind beide Proteine stärker exprimiert (Abb. 17).



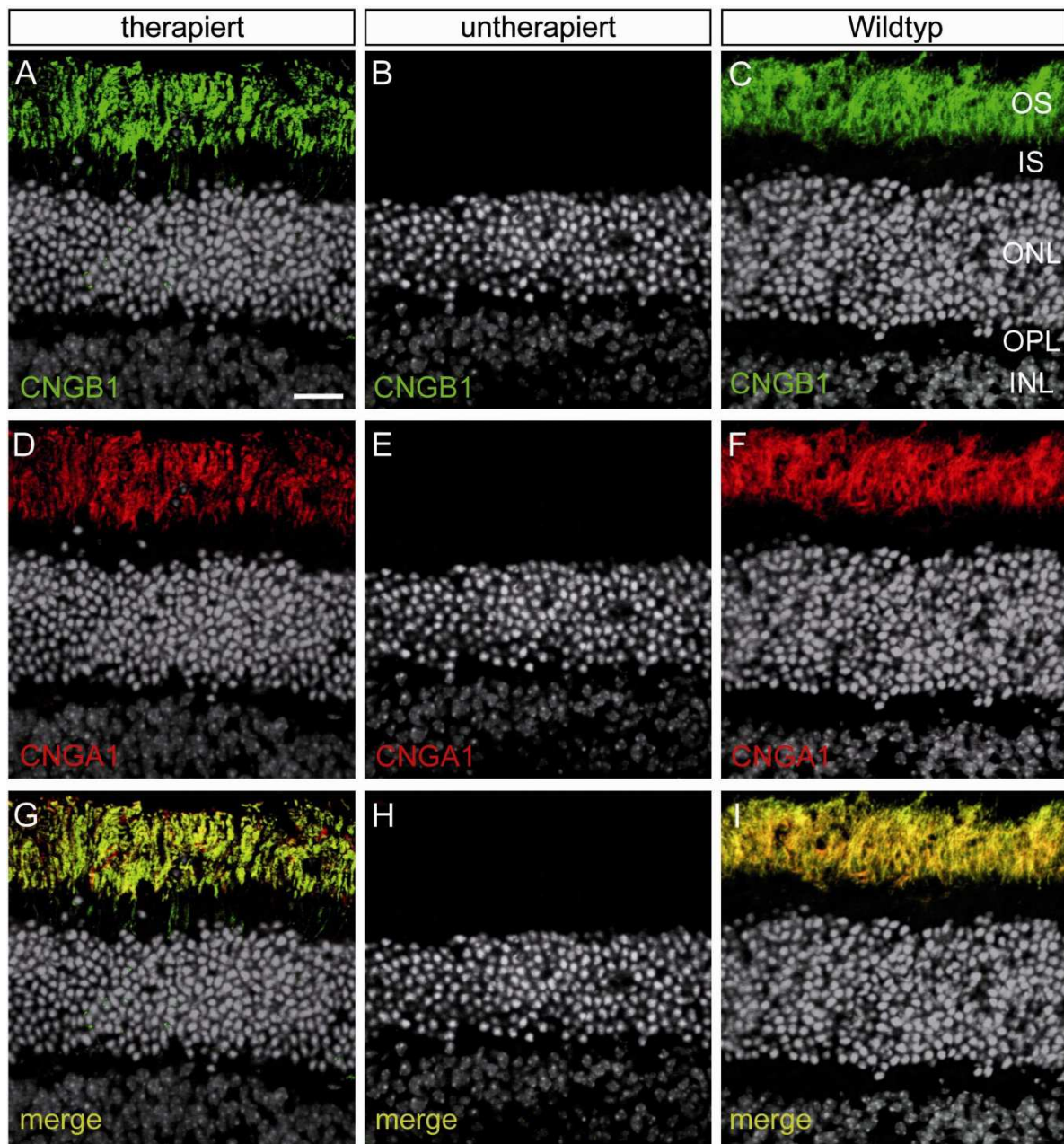
**Abb. 17: Western Blot mit Retina-Lysaten von Wildtyp-Mäusen sowie von therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen.** Bei untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen konnte weder das CNGB1- (oberes Bild) noch CNGA1-Protein (mittleres Bild) nachgewiesen werden. Bei therapierten CNGB1-defizienten Mäusen hingegen waren beide Proteine zu detektieren. Anti-Tubulin (unteres Bild) diente als Ladekontrolle.

Die im Western Blot gezeigte Expression des CNGB1-Proteins in der Retina von therapierten Mäusen wurde mittels Immunhistochemie bestätigt. Abbildung 18 zeigt einen mikroskopischen Überblick über die Netzhaut einer therapierten CNGB1-defizienten Maus. Das CNGB1-Protein ist in etwa einem Drittel der Retina exprimiert (Abb. 18).



**Abb. 18: Übersichtsbild der Retina einer therapierten CNGB1-defizienten Maus.** Der therapierte Bereich ist durch die Expression von CNGB1 (grün) gekennzeichnet. Die Zellkerne wurden mit dem Zellkernmarker Hoechst 33342 gefärbt (grau). Der Maßstabsbalken markiert 200  $\mu\text{m}$ .

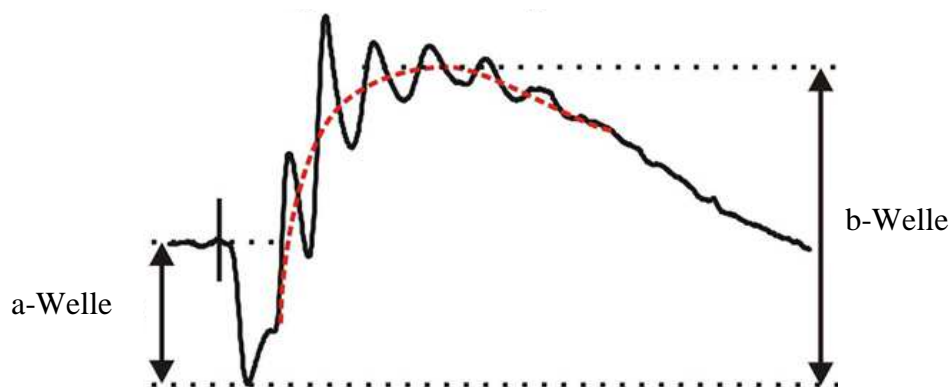
Ein vergrößerter Ausschnitt des therapierten Bereichs zeigt, dass das CNGB1-Protein fast ausschließlich in den Außensegmenten lokalisiert ist (Abb. 19A), und zwar in einem dem Wildtyp ähnlichen Expressionslevel (Abb. 19C). In Übereinstimmung mit der Literatur (Hüttl et al., 2005) fehlt das Signal in der Retina von untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen vollständig (Abb. 19B). Weiter war das CNGA1-Protein in den Außensegmenten von therapierten CNGB1-defizienten Mäusen nachzuweisen (Abb. 19D). Das Expressionslevel ist mit dem Wildtyp vergleichbar (Abb. 19F). Das CNGA1-Protein konnte in der untherapierten Retina nicht detektiert werden (Abb. 19E). Sowohl in der Wildtyp- als auch in der therapierten Retina sind beide Proteine in den Außensegmenten co-lokalisiert (Abb. 19G/I).



**Abb. 19: Expression des Stäbchen-CNG-Kanals in den Außensegmenten von therapierten CNGB1-defizienten Mäusen.** Sowohl CNGB1 (grün) (A) als auch CNGA1 (rot) (D) sind in der therapierten Retina exprimiert. Beide Proteine sind in den Außensegmenten co-lokalisiert (G). Das Expressionslevel ist mit dem Wildtyp (C,F,I) vergleichbar. In der untherapierten Retina konnte kein Signal detektiert werden (B,E,H). Der Maßstabsbalken markiert 20  $\mu\text{m}$ . OS, Außensegment; IS, Innensegment; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht.

### 3 Evaluation der Netzhautfunktion durch Elektroretinogramme

Die Expression und Co-Lokalisation von CNGB1 und CNGA1 in den Außensegmenten von therapierten CNGB1-defizienten Mäusen zeigte, dass sich der CNG-Kanal der Stäbchen, der in der Retina von untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen fehlt, nach Injektion der rAAV-Vektoren bildet. Als nächstes folgten funktionelle Untersuchungen mittels Elektroretinographie. Das Elektroretinogramm (ERG) gibt das zeitabhängige Spannungssignal wieder, das als Antwort der Netzhaut auf Lichtreize entsteht. Die elektrischen Potenziale, die an der Hornhaut abgeleitet werden, weisen eine charakteristische Kurvenform auf. Zu unterscheiden sind ein negativer Ausschlag (a-Welle), der überwiegend von den Fotorezeptoren stammt und erst bei höheren Blitzintensitäten erscheint, und ein positiver Ausschlag (b-Welle), der die Aktivität der Bipolarzellen widerspiegelt (Tanimoto et al., 2009) (Abb. 20).



**Abb. 20: Komponenten eines Elektroretinogramms.** Das Elektroretinogramm weist eine charakteristische Kurvenform auf: Man sieht eine a-Welle, die überwiegend von den Fotorezeptoren generiert wird, und eine b-Welle, welche die Aktivität der Bipolarzellen widerspiegelt. Die roten Punkte stellen die Mittelwerte der Amplituden aus den abgeleiteten oszillatorischen Potenzialen der b-Welle dar. Für die Auswertung der Netzhautfunktion von therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen wurden die Amplituden der b-Wellen miteinander verglichen. Die Amplitude der b-Welle misst man vom maximalen negativen Ausschlag bis zum maximalen positiven Ausschlag. Modifiziert nach (Tanimoto et al., 2009).

Mit Hilfe von ERGs kann man demnach überprüfen, ob Fotorezeptoren in der Lage sind, Lichtreize zu generieren, und ob diese korrekt an die nachgeschalteten Bipolarzellen weitergeleitet werden (Tanimoto et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Seeliger (AG Neurodegeneration des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen) untersuchte die Netzhautfunktion von sechs therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen im Alter von acht Wochen: Nach einer Dunkeladaptation über Nacht (skotopische Bedingung) wurden zehn Lichtreize mit steigender Intensität von  $-4$  bis  $1,5 \log \text{ cd/m}^2$  appliziert, um die Stäbchenfunktion zu überprüfen.

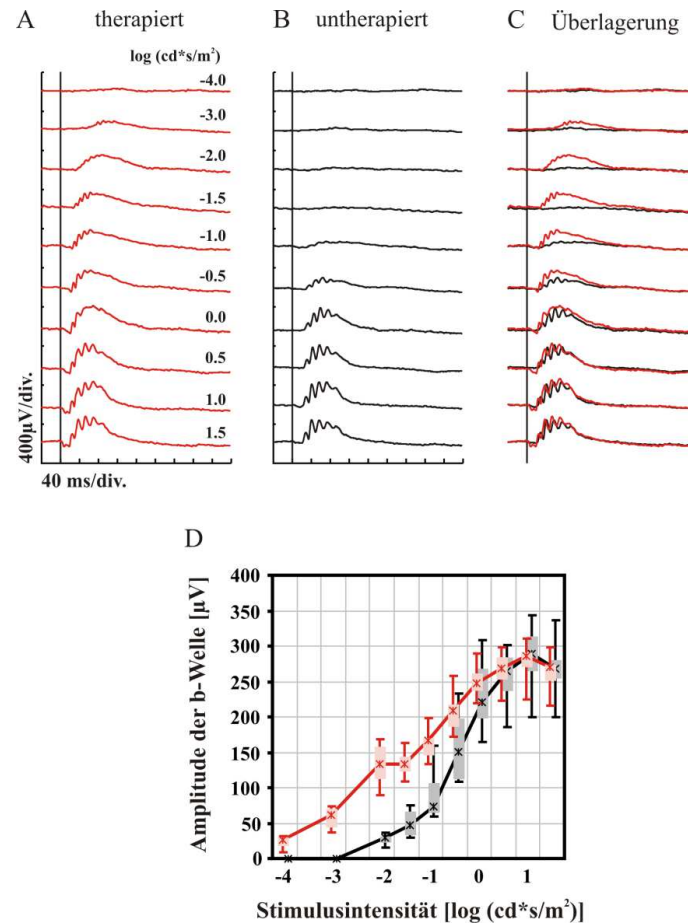


Bei Lichtreizen von niedriger Intensität (von  $-4,0$  bis  $-0,5 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ ), welche die Aktivität des Stäbchensystems widerspiegeln, ließen sich beim untherapierten Auge einer CNGB1-defizienten Maus keine elektrischen Antworten ableiten. Erst bei Lichtreizen hoher Intensitäten (ab  $0 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ ) waren elektrische Potenziale messbar, da dann auch das Zapfensystem aktiv ist (Abb. 21B). Im Gegensatz dazu war es beim therapierten Auge möglich, bereits auf Lichtreize von niedriger Intensität (ab  $-3,0 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ ) eine b-Welle abzuleiten (Abb. 21A). Die Überlagerung der repräsentativen Einzelspuren zeigt deutlich, dass die Netzhaut einer therapierten CNGB1-defizienten Maus auf schwache Lichtblitze antwortet, die bei einer untherapierten CNGB1-defizienten Maus zu keiner elektrischen Antwort führt (Abb. 21C). Bei Lichtblitzen, die auch das Zapfensystem aktivieren, ist kein Unterschied zwischen therapiertem und untherapiertem Auge zu sehen, da die Zapfen bei acht Wochen alten CNGB1-defizienten Mäusen noch funktionsfähig sind (Abb. 21C). Das beweist außerdem, dass sich die Gentherapie nicht negativ auf die Zapfenfunktion auswirkt.

Für eine Auswertung der Netzhautfunktion von therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen analysierte man die Amplitude der b-Welle. Diese wurde vom maximalen negativen Ausschlag bis zum maximalen positiven Ausschlag gemessen und als Funktion der logarithmierten Stimulusintensität aufgetragen. Obwohl die Bipolarzellen die b-Welle bilden, reflektiert diese indirekt die Aktivität der Fotorezeptoren, da das Messen einer b-Welle die Funktion der Fotorezeptoren voraussetzt. Unter skotopischen Bedingungen sowie Lichtreizen von geringer Intensität werden hauptsächlich die ON-Bipolarzellen der Stäbchen gemessen.

Die Amplitude der b-Welle von therapierten CNGB1-defizienten Mäusen ist bei Lichtreizen geringer Intensität ( $-4,0$  bis  $-2,0 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ ) signifikant größer als die von untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen (Abb. 21D). Das beweist, dass dieser Gentherapieansatz die Stäbchen-vermittelte Netzhautaktivität deutlich verbessert.

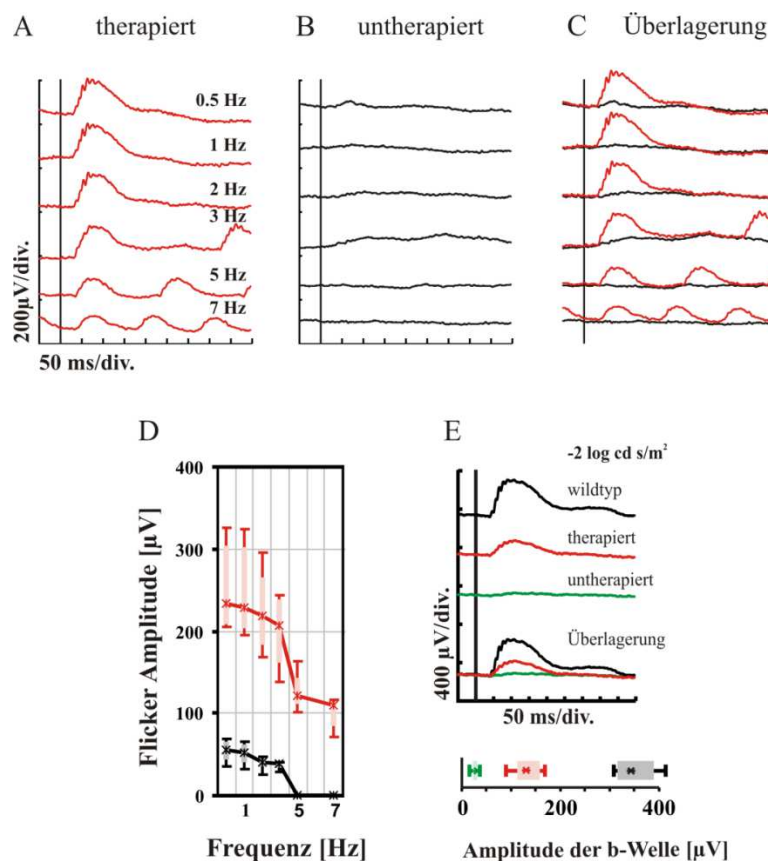




**Abb. 21: Einzelblitz-Elektroretinogramm-Ableitungen unter skotopischen Bedingungen.** Die repräsentativen Einzelspuren zeigen, dass im therapierten Auge (A) – im Gegensatz zum untherapierten Auge (B) – einer CNGB1-defizienten Maus elektrische Antworten auf Lichtblitze geringer Intensitäten messbar waren. Dies wird auch bei Überlagerung der beiden Spuren deutlich (C). Die Amplitude der b-Welle ist bei geringen Stimulusintensitäten bei therapierten CNGB1-defizienten Mäusen (rote Linie) signifikant größer als bei untherapierten (schwarze Linie) (D).

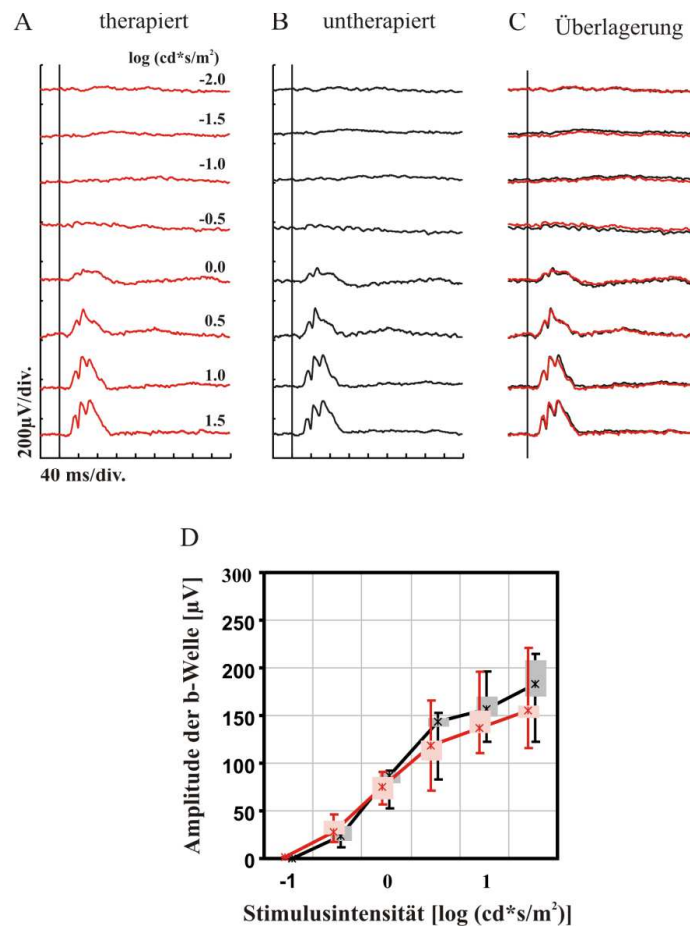
Zusätzlich zu Einzelblitzableitungen kann man ERG-Antworten auch auf eine Folge von Lichtblitzen erhalten (Flimmer-ERG). Bei einer Stäbchen-spezifischen (skotopischen) Lichtintensität ( $-2 \log \text{cd} \cdot \text{s/m}^2$ ) waren beim untherapierten Auge im Flimmer-ERG keine elektrischen Potenziale messbar (Abb. 22B). Das therapierte Auge war dagegen in der Lage, die Flimmerreize verschiedener Frequenzen (von 0,5 bis 7 Hz) aufzulösen (Abb. 22A). Die Überlagerung der Einzelspuren macht den Unterschied zwischen dem therapierten und dem untherapierten Auge deutlich (Abb. 22C).

Die Auswertung der b-Wellen-Amplitude zeigte, dass die Antworten des Stäbchensystems beim untherapierten Auge kaum nachweisbar sind; die Stäbchen-generierten Amplituden beim therapierten Auge waren signifikant größer (Abb. 22D). Ein Vergleich von repräsentativen Einzelspuren machte deutlich, dass die Form der b-Welle einer therapierten CNGB1-defizienten Maus mit einer Wildtyp-Maus vergleichbar war (Abb. 22E). Die ERG-Amplitude der therapierten Augen entsprach etwa 1/3 der Wildtyp-Amplitude (Abb. 22E).



**Abb. 22: Flimmer-Elektroretinogramm-Ableitungen unter skotopischen Bedingungen.** Die repräsentativen Einzelspuren eines therapierten (A) und eines untherapierten Auges (B) einer CNGB1-defizienten Maus unterscheiden sich deutlich: Nur beim therapierten Auge waren elektrische Antworten auf Stäbchen-spezifische Lichtreize im getesteten Frequenzbereich abzuleiten (C). Die quantitative Auswertung der Daten zeigt eine signifikant erhöhte Flicker-Amplitude der therapierten Augen (rote Linie) im Vergleich mit den untherapierten Augen (schwarze Linie) (D). Die Amplitude der b-Welle entspricht etwa 1/3 der Wildtyp-Amplitude (E).

Beim Einzelblitz-Elektroretinogramm unter photopischen Bedingungen wurden acht Lichtreize von - 2 bis 1,5  $\log \text{ cd/m}^2$  appliziert. Unter photopischen Bedingungen versteht man die Applikation von Lichtblitzen auf das helladaptierte Auge in Gegenwart einer Hintergrundbeleuchtung ( $30 \text{ cd/m}^2$ ). Da unter diesen Messbedingungen die Stäbchen gesättigt sind, können selektiv die Antworten der Zapfen gemessen werden. Es waren keine Unterschiede zwischen dem untherapierten und dem therapierten Auge einer CNGB1-defizienten Maus festzustellen (Abb. 23). Das beweist, dass die subretinale Injektion der Rho-CNGB1a AAV-Vektoren keinen negativen Effekt auf die Zapfenfunktion hatte.



**Abb. 23: Einzelblitz-Elektroretinogramm-Ableitungen unter photopischen Bedingungen.** Die repräsentativen Einzelspuren zeigen keinen Unterschied zwischen dem therapierten (A) und dem untherapierten Auge (B) einer CNGB1-defizienten Maus. Dies wird auch bei Überlagerung der beiden Spuren deutlich (C). Die Amplitude der b-Welle ist bei therapierten CNGB1-defizienten Mäusen (rote Linie) genauso groß wie bei untherapierten (D).

#### **4 Untersuchung der Sehfähigkeit anhand eines Sehtests**

Die ERG-Messungen haben gezeigt, dass die ursprünglich funktionslosen Stäbchen nach der Genersatztherapie auf Lichtreize antworten. Die wiederhergestellte elektrische Aktivität der Netzhaut wirft die Frage auf, ob das Gehirn diese Signale verarbeiten kann. CNGB1-defizienten Mäusen fehlen von Geburt an funktionsfähige Stäbchen, das heißt der visuelle Cortex hat bislang keine visuellen Informationen durch die Stäbchen bekommen. In einem Verhaltensversuch wurde deshalb die Sehfähigkeit der Mäuse abgefragt. Die Mäuse wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen trainiert, anhand von Markierungen eine Plattform aus durchsichtigem Plexiglas in einem Water Maze (rundes, mit Wasser gefülltes Becken) zu finden. Die Plattform blieb über die Versuchsdauer an konstanter Stelle, die Startposition der Maus variierte nach jedem Durchgang. Jeden Tag fanden acht Durchgänge statt. An den ersten drei Tagen wurden die Mäuse unter Lichtbedingungen ( $0,32 \text{ cd/m}^2$ ), bei denen nur die Stäbchen aktiv sind, getestet.

Die Wildtyp-Mäuse brauchten am ersten Tag im Durchschnitt  $48 \pm 11$  Sekunden, um die Plattform zu finden. Am zweiten Tag benötigten sie  $23 \pm 5$  Sekunden, und am dritten Tag lösten sie die Aufgabe in  $7 \pm 1$  Sekunden. Somit verbesserten sich die Wildtyp-Mäuse signifikant ( $p = 0,0009$ , einfaktorielle Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA)) (Abb. 24A); sie haben die externen Hinweisreize, die unter anderem an den Wänden des Beckens befestigt waren, gesehen und gelernt, diese als Orientierungshilfe zu nutzen, um die Plattform zu finden. Den untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen war es dagegen nicht möglich, sich signifikant zu verbessern: Im Durchschnitt brauchten sie von der Startposition bis zur Plattform am ersten Tag  $90 \pm 8$  Sekunden, am zweiten Tag  $73 \pm 11$  und am dritten Tag  $68 \pm 11$  Sekunden ( $p = 0,2660$ , einfaktorielle ANOVA) (Abb. 24A). Die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse konnten unter den herrschenden Lichtbedingungen die Markierungen nicht sehen und brauchten signifikant länger als die Wildtyp-Mäuse ( $p < 0,001$ , zweifaktorielle ANOVA). Die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse dagegen verbesserten sich im Laufe der drei Tage: Sie benötigten am ersten Tag durchschnittlich  $60 \pm 11$  Sekunden, am zweiten  $39 \pm 4$  und am dritten Tag  $23 \pm 5$  Sekunden bis zum Erreichen der Plattform ( $p = 0,0127$ , einfaktorielle ANOVA) (Abb. 24A). Sie waren signifikant schneller als die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse ( $p = 0,0123$ , zweifaktorielle ANOVA). Auch wenn die Latenzzeiten der Wildtyp-Mäuse nicht erreicht wurden, unterscheiden sich die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse in ihrer Gesamtperformance nicht von den Wildtyp-Mäusen ( $p = 0,0834$ , zweifaktorielle ANOVA). Das beweist,

dass die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse im Gegensatz zu den untherapierten bei Dämmerlicht sehen können.

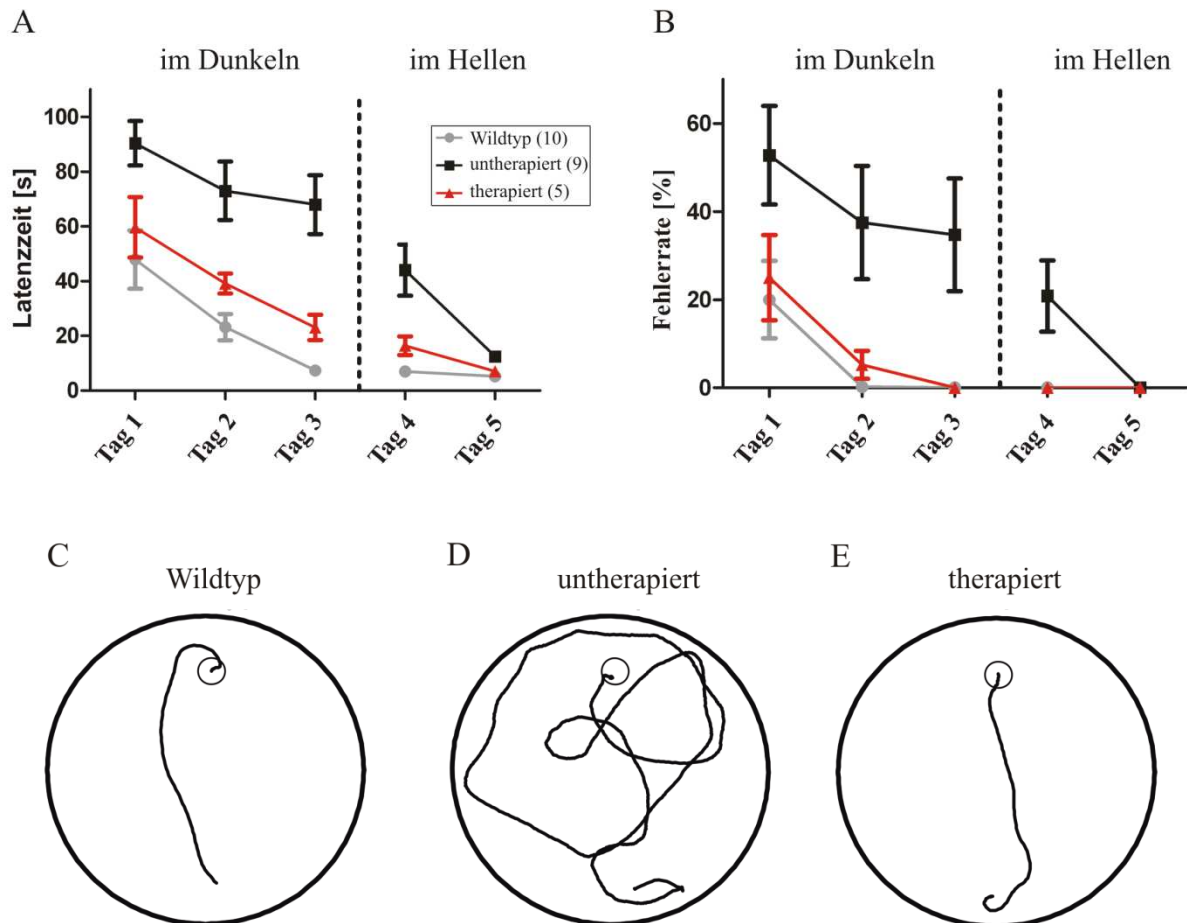
Die repräsentativen Schwimmpfade verdeutlichen, dass die Wildtyp-Mäuse (Abb. 24C) und die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse (Abb. 24D) zielgerichtet auf die Plattform zugeschwommen sind, wohingegen die CNGB1-defizienten Mäuse (Abb. 24E) diese – wenn überhaupt – nur durch Zufall gefunden haben.

Am vierten und fünften Tag wurde der Versuch unter Lichtbedingungen durchgeführt, bei denen die Zapfen aktiv sind, um auszuschließen, dass die CNGB1-defizienten Mäuse auf Grund motorischer Defizite oder Schwierigkeiten beim räumlichen Lernen schlechter als die Wildtyp- und die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse abschneiden. Die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse sollten unter diesen Lichtbedingungen die Aufgabe ebenfalls lernen, da die Zapfen erst mit etwa sechs Monaten degenerieren (Hüttl et al., 2005). Tatsächlich konnten die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse ihre Latenzzeit von  $44 \pm 9$  Sekunden am vierten Tag auf  $13 \pm 2$  Sekunden am fünften Tag verbessern (Abb. 24B). Sie fanden die Plattform am fünften Tag genauso schnell wie die Wildtyp- und die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse. Die Wildtyp- und die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse erreichten an beiden Tagen innerhalb weniger Sekunden die Plattform, da sie die Aufgabe bereits an den drei vorangegangenen Tagen gelernt hatten (Abb. 24A). Dies zeigt auch, dass es durch die subretinale Injektion der therapeutischen Viren zu keiner Beeinträchtigung des Zapfensystems gekommen ist.

Die therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Latenzzeit, sondern auch darin, ob sie die Plattform während eines Durchgangs überhaupt finden. Die Wildtyp-Mäuse konnten am zweiten Tag in nur 2,5% der Durchgänge die Plattform nicht finden. Am dritten, vierten und fünften Tag erreichten alle Wildtyp-Mäuse die Plattform innerhalb von 120 Sekunden (Abb. 24B). Die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse gelangten dagegen sehr häufig nicht zur Plattform. Am ersten Tag wurde die Plattform in über der Hälfte der Durchgänge (53%) nicht gefunden, am zweiten und dritten Tag traf dies in 38% bzw. 35% der Durchgänge zu. Erst als der Versuch im Hellen stattfand, konnten sich die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse steigern und erreichten am fünften Tag die Plattform immer (Abb. 24B). Die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse

fanden dagegen die Plattform bereits am zweiten Tag in 95% der Durchgänge und an allen weiteren Tagen zu 100% (Abb. 24B).

Dieser Verhaltensversuch bestätigt, dass die durch die Stäbchen vermittelte Sehfähigkeit der CNGB1-defizienten Mäuse nach der Genersatztherapie wiederhergestellt werden konnte.



**Abb. 24: Sehtest bei therapierten CNGB1-defizienten Mäusen.** Wildtyp-Mäuse und therapierte sowie untherapierte CNGB1-defiziente Mäuse wurden trainiert, anhand räumlicher Markierungen eine Plattform in einem Water Maze zu lokalisieren. An den ersten drei Tagen wurde der Versuch unter Lichtbedingungen durchgeführt, bei denen nur die Stäbchen aktiv sind. Die Wildtyp-Mäuse und die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse haben sich – im Gegensatz zu den untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen – in den drei Tagen signifikant verbessert. Am vierten und fünften Tag wurde der Versuch unter hellen Lichtbedingungen durchgeführt. Die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse lernten unter diesen Bedingungen die Aufgabe ebenfalls, da die Zapfen noch funktionsfähig waren (A). Die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse haben – ähnlich den Wildtyp-Mäusen – bereits am zweiten Tag die Plattform fast immer gefunden, wohingegen die untherapierten CNGB1-defizienten Mäuse in beinahe einem Drittel der Durchgänge erfolglos blieben (B). Die repräsentativen Schwimmwege zeigen, dass die Wildtyp-Maus (C) und die therapierte CNGB1-defiziente Maus (D) zielgerichtet zur Plattform geschwommen sind, wohingegen die untherapierte Maus (E) diese nur durch Zufall gefunden hat.

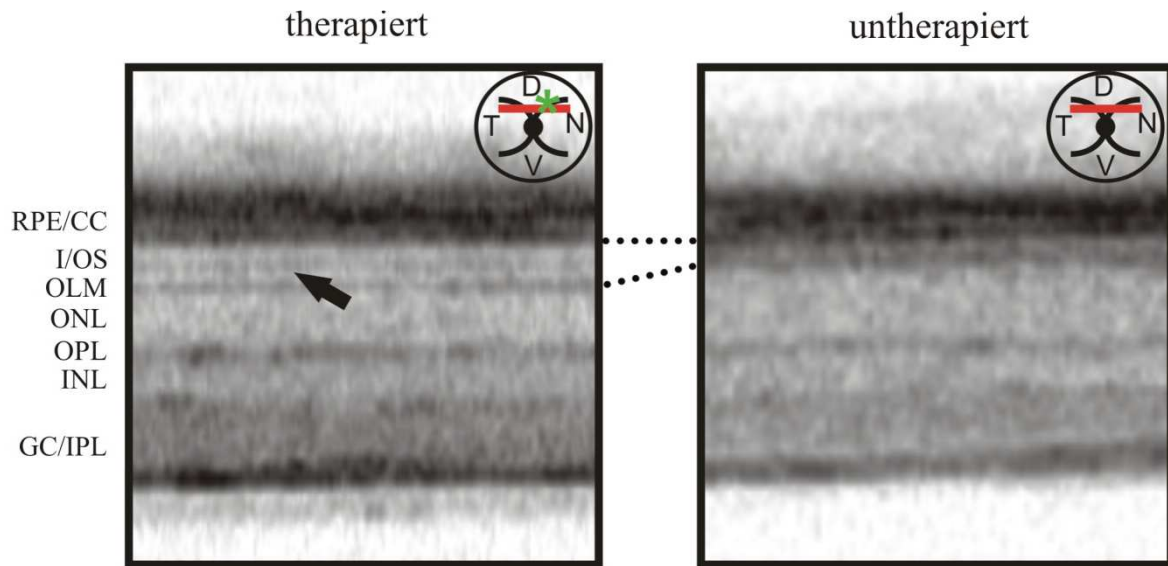
## 5 Einfluss der Gentherapie auf die retinale Degeneration

Die Verhaltensversuche erwiesen, dass die Sehfähigkeit der therapierten CNGB1-defizienten Mäuse im Dunkeln wiederhergestellt werden konnte. Da bei Retinitis pigmentosa im Laufe der Zeit die Fotorezeptoren absterben, was zur kompletten Erblindung führen kann (Hartong et al., 2006), ist eine wichtige Frage, ob unsere Therapiestrategie in der Lage ist, diese Degeneration zu verlangsamen. Im Anfangsstadium der Erkrankung verkürzen sich bei Retinitis pigmentosa die Außensegmente der Stäbchen (Fariss et al., 2000; Milam et al., 1998). Diese frühe Veränderung wurde auch bei CNGB1-defizienten Mäusen beobachtet: Der Verlust der Membranscheiben (Discs), die anfangs noch gleichmäßig und zu hunderten in den Außensegmenten gestapelt sind (Gilliam et al., 2012), beginnt bereits kurz nach Öffnen der Augen im Alter von 15 Tagen (Hüttl et al., 2005).

Mit Hilfe der optischen Kohärenztomografie (optical coherence tomography, OCT) kann man derartige pathologische Veränderungen abbilden. Bei diesem bildgebenden Untersuchungsverfahren wird die Netzhaut *in vivo* mit einem schwachen Laserlicht abgetastet; die Reflexionen der Lichtsignale an den verschiedenen Netzhautstrukturen werden gemessen und zweidimensionale Bilder rekonstruiert (Fujimoto, 2003). Die verschiedenen retinalen Schichten werden durch das OCT je nach Gewebedichte in unterschiedlichen Grautönen dargestellt. Die äußere und innere Körnerschicht zum Beispiel weisen auf Grund ihrer hohen optischen Dichte ein helleres Grau auf als die äußere plexiforme Schicht mit ihrer weniger hohen Dichte (Fischer et al., 2009).

Die morphologische Untersuchung mittels OCT führte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Seeliger (AG Neurodegeneration des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Universität Tübingen) durch. Die Netzhautdicke und Netzhautstruktur von therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen wurde im Alter von 10 Wochen vermessen. Die feine Schichtstruktur der Retina ist bei untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen teilweise erkennbar: Die Ganglienzellschicht, die innere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht und die äußere plexiforme Schicht sind gut erhalten; auch die Netzhautdicke der äußeren Körnerschicht unterscheidet sich zu diesem Zeitpunkt nicht von den therapierten CNGB1-defizienten Mäusen. Allerdings sind die Außen- und Innensegmente fast verschwunden (Abb. 25). Bei therapierten CNGB1-defizienten Mäusen desselben Alters erscheinen diese Schichten dagegen unversehrt. Die Schicht zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der äußeren

Grenzmembran, in der die Außen- und Innensegmente liegen, ist um ein Vielfaches dicker im Vergleich mit der untherapierten Retina einer CNGB1-defizienten Maus (Abb. 25).

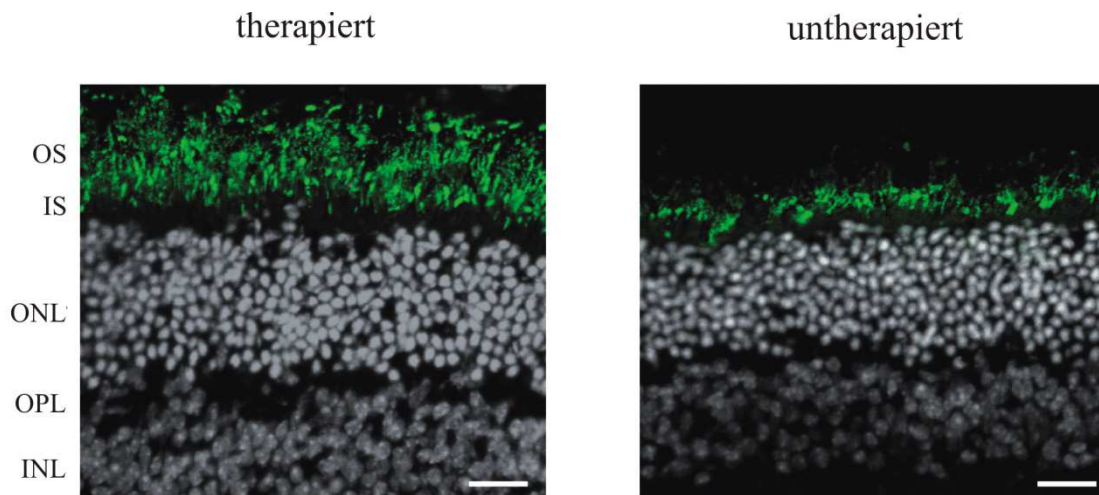


**Abb. 25: Optische Kohärenztomografie (OCT) der Netzhaut von therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen.** Die OCT-Scans zeigen, dass bei therapierten CNGB1-defizienten Mäusen die Außen- und Innensegmente erhalten bleiben; bei untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen gleichen Alters sind diese fast vollständig verschwunden. Die gestrichelten Linien verdeutlichen den Unterschied der Netzhautdicke in diesem Bereich zwischen therapierten und untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen. Der Pfeil markiert die Bande zwischen dem Außen- und dem Innensegment (I/OS). Die schematische Darstellung des Auges rechts oben im Bild zeigt die Injektionsstelle (grüner Stern) und die Position des Scans (rote Linie). D, dorsal; N, nasal; V, ventral; T, temporal; RPE/CC, retinales Pigmentepithel/ Choriocapillaris; OLM, äußere Grenzmembran; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; GC/IPL, Ganglienzell-, innere plexiforme Schicht.



Immunhistochemische Untersuchungen der Morphologie der Außensegmente bestätigen die OCT-Ergebnisse. Zur Markierung der Außensegmente wurde der Peripherin-2-Antikörper verwendet (Connell et al., 1991). Peripherin-2 ist ein Protein, das in der Discmembran der Außensegmente von Zapfen und Stäbchen lokalisiert und an der Morphogenese sowie Stabilisierung der Membranscheiben beteiligt ist (Arikawa et al., 1992; Connell et al., 1991).

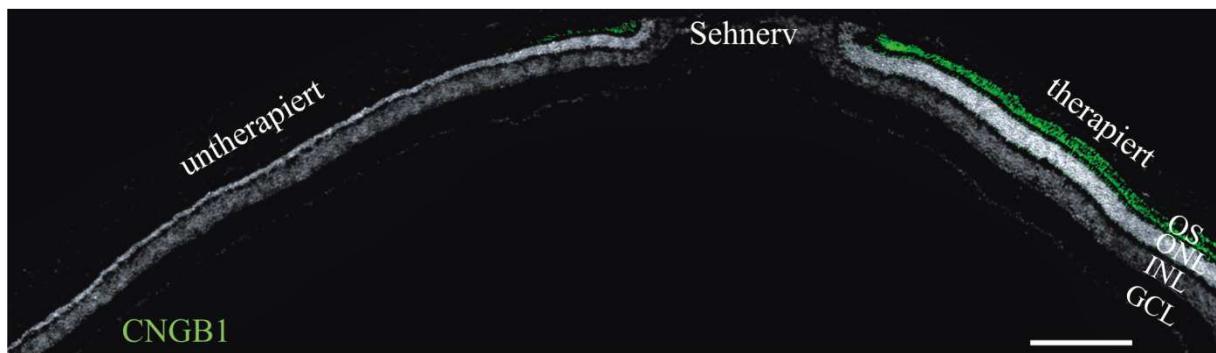
Bei 40 Tage alten untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen sind die Außensegmente stark verkürzt. Peripherin-2 ist nur in Resten von Außensegmenten nachweisbar. Diese Verkürzung der Außensegmente war in der Retina von therapierten CNGB1-defizienten Mäusen desselben Alters nicht zu beobachten. Die Außensegmente sind deutlich länger im Vergleich mit der untherapierten Retina (Abb. 26).



**Abb. 26: Immunhistochemische Untersuchung der Außensegmente.** Die immunhistochemische Färbung auf Peripherin-2, einem Protein das in den Außensegmenten lokalisiert ist, zeigt deutlich, dass die Außensegmente in der therapierten Retina beträchtlich länger sind als die der untherapierten. Der Maßstabsbalken markiert 20  $\mu\text{m}$ . OS, Außensegment; IS, Innensegment; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht.

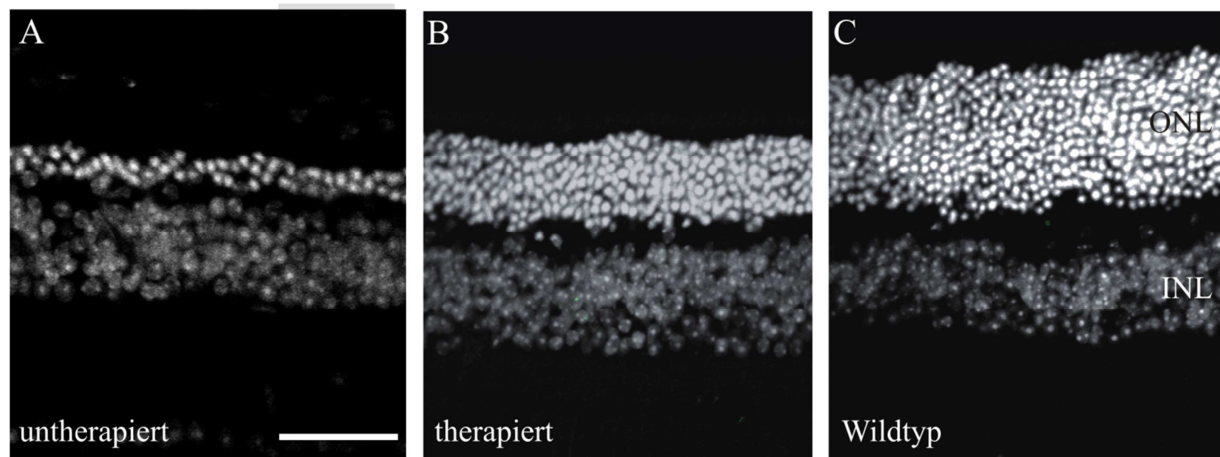
Die virale Expression von CNGB1 kann folglich das erste Anzeichen der Degeneration – die Verkürzung der Außensegmente – verhindern. Für eine dauerhaft erfolgreiche Therapie ist es von erheblicher Bedeutung, dass die Müllerzell-Gliose sowie spätere degenerative Prozesse, vor allem das Absterben der Stäbchen und Zapfen, gestoppt oder verlangsamt werden.

Zur Untersuchung der Langzeiteffekte der Gentherapie wurden sechs und zwölf Monate alte therapierte CNGB1-defiziente Mäuse untersucht. Es erwies sich, dass CNGB1 auch ein Jahr nach der subretinalen Injektion stabil in den Außensegmenten exprimiert wird. Der therapierte Bereich, der durch eine CNGB1-Expression gekennzeichnet war, entspricht etwa einem Drittel der gesamten Retina. Ein wichtiger Hinweis auf den lang anhaltenden Erfolg der Therapie war, dass der Teil der Retina mit CNGB1-Expression deutlich mehr Fotorezeptorzellreihen enthielt als der untherapierte Bereich (Abb. 27).



**Abb. 27: Langzeit-Expression von CNGB1.** Das Übersichtsbild der Retina einer 12 Monate alten therapierten CNGB1-defizienten Maus zeigt, dass CNGB1 (grün) in etwa einem Drittel der Retina in den Außensegmenten exprimiert war. Die äußere Körnerschicht (ONL) im therapierten Bereich enthielt deutlich mehr Zellreihen als der untherapierte Bereich. Der Maßstabsbalken markiert 100  $\mu\text{m}$ . OS, Außensegment; INL, innere Körnerschicht; GCL, Ganglienzellschicht.

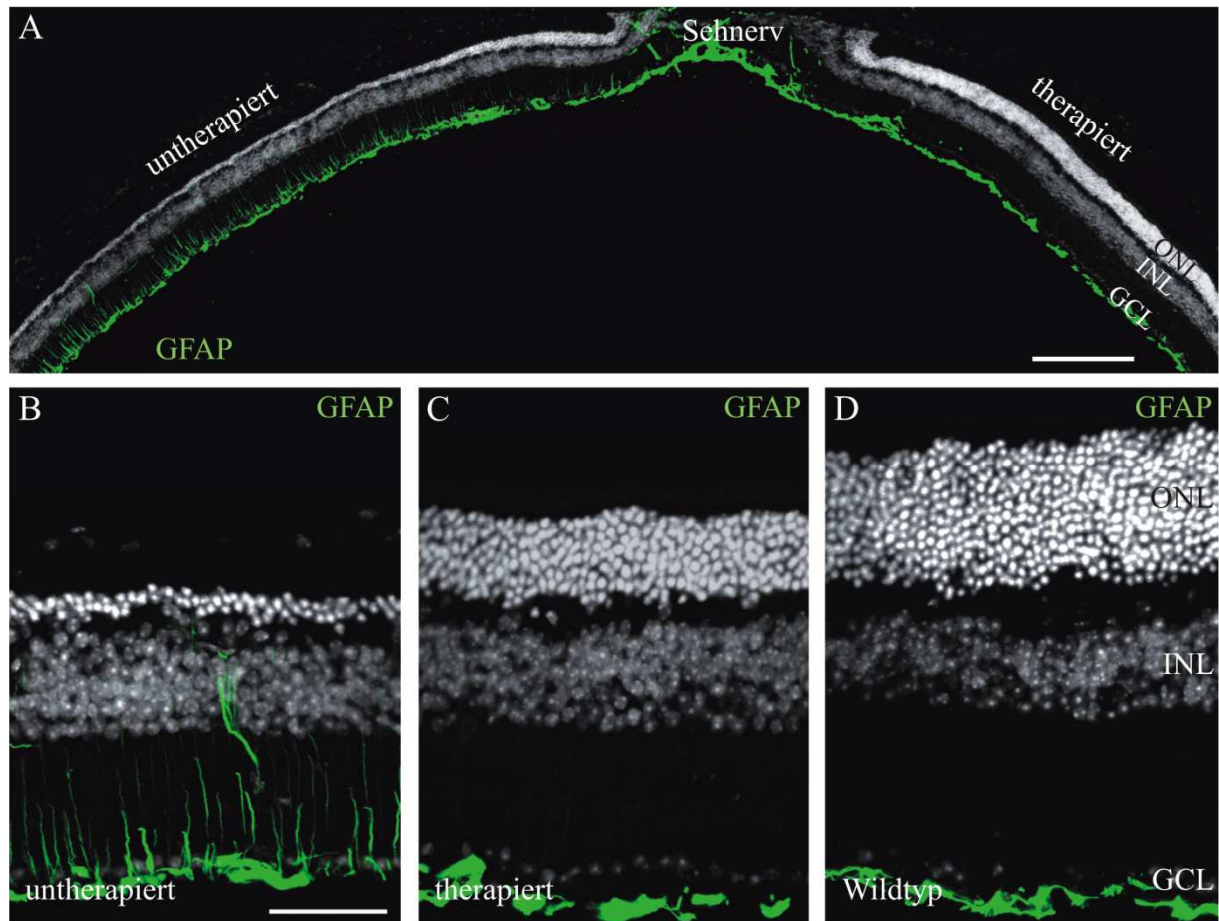
Die Schichtdicke der äußeren Körnerschicht ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Therapieerfolges, da diese den Degenerationsverlauf widerspiegelt. Das kann man am besten in hochauflösenden konfokalmikroskopischen Bildern beurteilen. Wildtyp-Mäuse haben etwa elf bis zwölf Fotorezeptorzellreihen (Abb. 28C); bei zwölf Monate alten CNGB1-defizienten Mäusen sind nur noch ein bis zwei Zellreihen übrig (Hüttl et al., 2005). Diese Abnahme der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht kann man im untherapierten Bereich der Retina sehen, die nur noch ein bis zwei Zellreihen aufweist. Die innere Körnerschicht und die Ganglienzellschicht wirken kaum verändert (Abb. 28A). Im therapierten Bereich dagegen verlangsamte sich die Degeneration der Fotorezeptoren: Die äußere Körnerschicht besteht aus sieben bis acht Zellreihen (Abb. 28B). Das zeigt, dass etwa 50% der Fotorezeptoren, die ohne Therapie untergegangen wären, gerettet werden konnten.



**Abb. 28: Verlangsamung des Absterbens der Fotorezeptoren.** Die äußere Körnerschicht (ONL) einer Wildtyp-Retina besteht aus elf bis zwölf Zellreihen (C). Bei untherapierten CNGB1-defizienten Mäusen im Alter von zwölf Monaten sind nur noch ein bis zwei Zellreihen übrig (A). Dieser starke Verlust konnte im therapierten Bereich der Retina CNGB1-defizienter Mäuse verhindert werden: Nach der Therapie sind noch sieben bis acht Zellreihen übrig (B). Der Maßstabsbalken markiert 20  $\mu\text{m}$ . INL, innere Körnerschicht.

Parallel zur Degeneration der Fotorezeptoren kommt es bei Retinitis pigmentosa zu einer Gliose der Müllergliazellen (Bringmann et al., 2006). Die Müllergliazellen werden als Antwort auf das Absterben der Fotorezeptoren aktiviert. Dieser Prozess ist durch eine verstärkte Expression des sauren Gliafaserproteins (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) gekennzeichnet, das man als Marker für die reaktive Gliose verwenden kann (Bringmann and Reichenbach, 2001; Pekny and Nilsson, 2005). Um den lang anhaltenden Therapieerfolg auf Ebene der Müllergliazellen zu evaluieren, wurde die Retina einer 12 Monate alten therapierten CNGB1-defizienten Maus auf GFAP gefärbt.

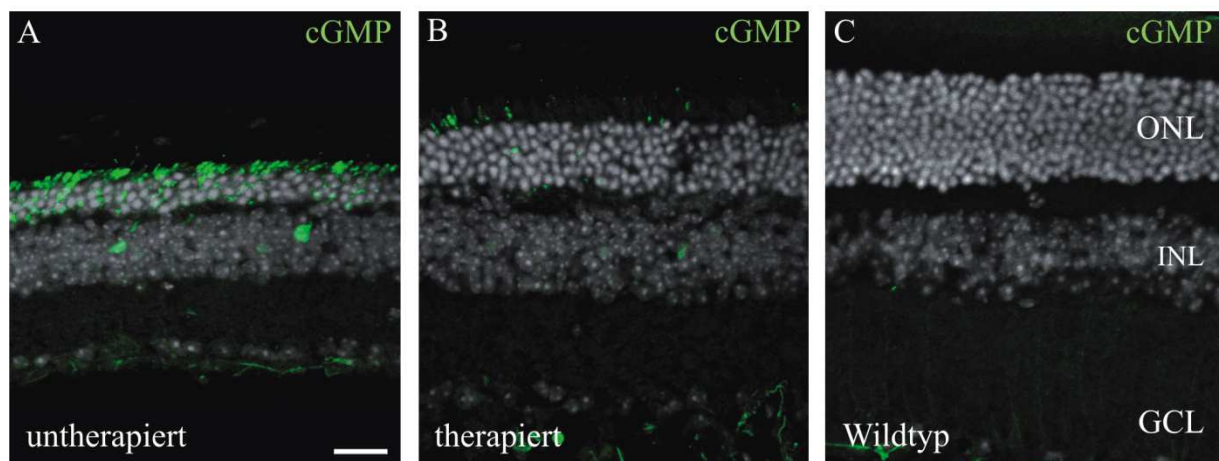
Die GFAP-positiven Müllergliazellen sind im untherapierten Bereich deutlich aktiviert (Abb. 29A). Die GFAP-positiven Fasern erstrecken sich bis in die innere Körnerschicht (Abb. 29B). In der Wildtyp-Retina ist GFAP nur im Bereich der Endfüße der Müllergliazellen exprimiert, die ausschließlich in der Schicht der Nervenfasern und Ganglienzellen lokalisiert sind (Abb. 29D). Die proliferierenden Müllergliazellen finden sich im therapierten Bereich der Retina nicht; die GFAP-Expression ist auf einem dem Wildtyp ähnlichen Niveau (Abb. 29C).



**Abb. 29: Verhinderung der Gliose durch Gentherapie.** Das Übersichtsbild zeigt die unterschiedliche GFAP-Expression im untherapierten und therapierten Bereich (A). Im untherapierten Bereich findet man eine stark erhöhte Anzahl von GFAP-positiven Gliafasern (grün), die bis in die innere Körnerschicht (INL) reichen (B). Die GFAP-Expression im therapierten Bereich ist dagegen nur in den Endfüßen der Müllergliazellen zu sehen (C) und unterscheidet sich nicht vom Wildtyp (D). Der Maßstabsbalken markiert 100  $\mu\text{m}$  in A bzw. 20  $\mu\text{m}$  in B. ONL, äußere Körnerschicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Weiter wurden die cGMP-Level mit einem cGMP-spezifischen Antikörper (Tanaka et al., 1997) überprüft. cGMP ist ein wichtiger Botenstoff bei der visuellen Signaltransduktion: Abhängig von der intrazellulären cGMP-Konzentration, sind die CNG-Kanäle geöffnet oder geschlossen. Im Dunkeln enthalten die Fotorezeptoren eine hohe cGMP-Konzentration, was zu einer Öffnung der CNG-Kanäle führt; wird cGMP in Folge eines Lichtreizes durch die retinale Phosphodiesterase abgebaut, schließen sich die CNG-Kanäle. Der cGMP-Spiegel der Zelle regeneriert sich durch die Guanylylzyklase, die durch eine geringe Calcium-Konzentration aktiviert wird (Luo et al., 2008). Dieses cGMP-Gleichgewicht aus dem Abbau durch die Phosphodiesterase und der Synthese durch die Guanylylzyklase ist in verschiedenen Mauslinien für retinale Degeneration gestört: Im Laufe der Zeit kommt es zu einer Akkumulation von cGMP (Farber and Lolley, 1974; Michalakakis et al., 2010; Paquet-Durand et al., 2011; Paquet-Durand et al., 2009; Trifunovic et al., 2010). Auch bei CNGB1-defizienten Mäusen sollte cGMP akkumulieren: Auf Grund der fehlenden CNG-Kanäle in den Stäbchen sollte der Calcium-Spiegel in der Zelle erniedrigt sein, die Guanylylzyklase aktiviert und cGMP synthetisiert werden.

Im untherapierten Bereich der Retina einer sechs Monate alten CNGB1-defizienten Maus war eine starke cGMP-Akkumulation zu sehen (Abb. 30A). Im therapierten Bereich war dagegen – genau wie in der Wildtyp-Retina – fast kein cGMP-Signal detektierbar (Abb. 30B/C). Das Gleichgewicht der cGMP-Konzentration in der visuellen Signalkaskade konnte demnach durch die Gentherapie wiederhergestellt werden.

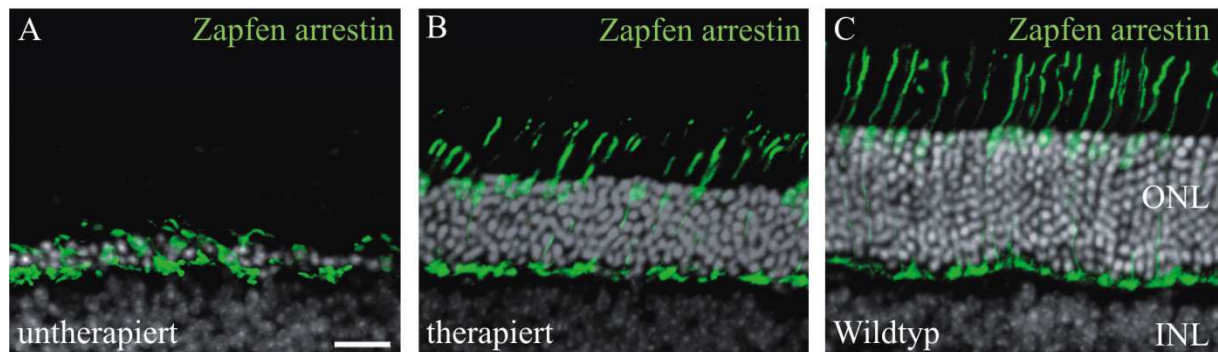


**Abb. 30: Ausbleiben der cGMP-Akkumulation im therapierten Bereich einer CNGB1-defizienten Retina.** Die erhöhte cGMP-Konzentration (grün) im untherapierten Bereich ist bei sechs Monate alten CNGB1-defizienten Mäusen deutlich erkennbar (A). Im therapierten Bereich ist dagegen kein Signal zu sehen (B) – die cGMP-Konzentration ist dem Wildtyp ähnlich (C). Der Maßstabsbalken markiert 20µm. ONL, äußere Körnerschicht; INL, innere Körnerschicht; GCL, Ganglienzellschicht.



Im Endstadium der Erkrankung degenerieren die Zapfen sekundär zu den Stäbchen, so dass Retinitis pigmentosa-Patienten häufig völlig erblinden (Hartong et al., 2006; Sahel et al., 2010). Bislang ist noch nicht letztlich geklärt, warum auch die Zapfen sterben, obwohl das mutierte Gen nicht in den Zapfen exprimiert wird. Vermutlich spielen dabei mehrere Einflüsse eine Rolle: das Fehlen von trophischen Faktoren, welche die Stäbchen abgeben, die Freisetzung von Toxinen, ausgelöst durch den Zelltod der Stäbchen, oxidativer Stress, der Verlust der Gap Junctions zwischen den Zapfen und Stäbchen, die Abnahme der Zelldichte und die damit verbundene Abnahme der Nährstoffe (Cronin et al., 2007; Punzo et al., 2009; Ripps, 2002).

Bei ein Jahr alten CNGB1-defizienten Mäusen ist die Degeneration der Zapfen weit fortgeschritten. Die Morphologie der Zapfen, die man durch den Zapfen-arrestin-Antikörper sichtbar machen kann (Zhang et al., 2012), ist stark verändert. Die klare Struktur aus Außen- und Innensegment, Zellkörper und Synapse ist nicht mehr zu erkennen (Abb. 31A). Die therapierten CNGB1-defizienten Mäuse dagegen haben noch zahlreiche Zapfen, deren Form gut erhalten ist (Abb. 31B) und den Zapfen von Wildtyp-Mäusen ähneln (Abb. 31C).



**Abb. 31: Verbesserte Morphologie der Zapfen.** Bei ein Jahr alten CNGB1-defizienten Mäusen sind die Zapfen stark degeneriert (A). Die Gentherapie verbesserte die Struktur der Zapfen deutlich – die Zapfen im therapierten Bereich (B) ähneln den Wildtyp-Zapfen sehr (C). Der Maßstabsbalken markiert 20µm. ONL, äußere Körnerschicht; INL, innere Körnerschicht.

## **V Diskussion**

### **1 Effizienz der Gensatztherapie bei CNGB1-defizienten Mäusen**

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich eine Gensatztherapie für das präklinische CNGB1-defiziente Mausmodell der Retinitis pigmentosa entwickelt. Das Ziel war, die Morphologie und Funktion bei CNGB1-defizienten Mäusen zu erhalten bzw. wiederherzustellen. Um dieses Ziel umzusetzen, wurde durch subretinale Injektion therapeutischer rAAV-Vektoren das CNGB1a-Gen in die Netzhaut eingeschleust und der Therapieerfolg auf zellulärer, histologischer und funktioneller Ebene nachgewiesen:

- 1) Immunhistochemische und proteinbiochemische Methoden belegten, dass das eingeschleuste CNGB1a-Gen tatsächlich spezifisch in Fotorezeptoren exprimiert und zum subzellulären Zielort – in die Außensegmente der Stäbchen – transportiert wurde.
- 2) Mit Hilfe von elektroretinographischen Messungen und Verhaltensexperimenten gelang der Nachweis, dass durch die Expression von CNGB1 die Funktionsdefizite der Stäbchen reversibel waren.
- 3) Immunhistochemische Untersuchungen über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr bewiesen den langanhaltenden Therapieeffekt.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Effizienz und die besondere Nachhaltigkeit des Therapieansatzes. Für den Erfolg der Therapie waren verschiedene methodisch-strategische Überlegungen ausschlaggebend. Eine entscheidende Rolle für die Zellspezifität und die Stärke der Expression spielt die Wahl der Transkriptions- und der Posttranskriptionselemente. Der Promotor stellt ein wesentliches Transkriptionselement dar, das die Spezifität und Effizienz der Transkription bestimmt. Für den in dieser Arbeit verwendeten Vektor wurde der fotorezeptor-spezifische Rhodopsin-Promotor verwendet (Flannery et al., 1997). Zur signifikanten Steigerung der Transgenexpression wurde als Posttranskriptionselement die SV40 Polyadenylierungssequenz in die Expressionskassette eingebaut. Dadurch kommt es zu einer 45 – 100% igen Steigerung der Genexpression (Schambach et al., 2007).

Bei der Optimierung der Expressionsstärke ist allerdings zu beachten, dass prinzipiell zwei Faktoren miteinander konkurrieren. Eine stabile und effiziente Expression des Transgens ist einerseits eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie; andererseits könnte



die Überexpression eines Kalziumkanals auch zum Zelltod führen. Daher ist bei gentherapeutischen Ansätzen die korrekte Gendosis absolut entscheidend. Eine Besonderheit des hier ausgewählten Modells für Retinitis pigmentosa liegt darin, dass eine ungewollte Überexpression des CNGB1-Gens durch die Verfügbarkeit der CNGA1-Untereinheit limitiert ist. Eine Expression, welche die natürlichen Levels übersteigt, ist damit so gut wie unmöglich. Diese Besonderheit folgt aus der Architektur des nativen CNG-Kanalkomplexes. In den Stäbchen setzt sich dieser Komplex aus einer CNGB1a- und drei CNGA1-Untereinheiten zusammen; nur in Anwesenheit beider Untereinheiten wird der Komplex in die Außensegmente transportiert (Hüttl et al., 2005). Das bedeutet, dass auch nach Überexpression von CNGB1 nur die im Wildtyp übliche Menge an CNG-Kanalkomplexen in die Außensegmente der Fotorezeptoren eingebaut wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche Gentherapie ist der Zeitpunkt der subretinalen Injektion. Da man die Funktion nur in Bereichen der Retina wiederherstellen kann, in denen noch Fotorezeptoren vorhanden sind, muss die Therapie vor Beginn der Fotorezeptordegeneration erfolgen. Bei CNGB1-defizienten Mäusen ist bereits ab Tag 16 ein erstes Absterben von Fotorezeptoren zu beobachten; an Tag 23 war das Maximum an absterbenden Zellen in der äußeren Körnerschicht erreicht (Paquet-Durand et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher 14 Tage alte CNGB1-defiziente Mäuse injiziert. Bei humanen Formen der Retinitis pigmentosa setzt die Degeneration der Retina wesentlich später ein, in der Regel im jungen Erwachsenenalter. Beim Menschen hätte man daher deutlich mehr Zeit, mit der Gentherapie zu beginnen.

Ein generelles technisches Problem rAAV-basierter Ansätze ist die sehr geringe Verpackungskapazität der rAAV-Vektoren. Die maximal verpackbare Obergrenze für cDNA liegt bei etwa 5,2 kb. Größere Konstrukte werden unvollständig und ineffizient verpackt (Dong et al., 2010; Lai et al., 2010; Wu et al., 2010). Dieses schwerwiegende Problem ist bisher nicht oder nur unzureichend gelöst. Zwar gibt es Studien, bei denen Expressionskassetten, die auf Grund der Größe des Transgens die Verpackungskapazität überschreiten, in zwei oder drei rAAV-Vektoren, die sich partiell überlappen, aufgeteilt wurden. Diesem Ansatz liegt die Hypothese zugrunde, dass die Konstrukte getrennt verpackt werden und sich die Fragmente in der Zielzelle in den überlappenden Sequenzbereichen durch homologe Rekombination korrekt komplementieren könnten. Allerdings ist die Expression dieser Transgene bislang *in vivo* noch sehr gering (Dong et al., 2010; Wu and Lu, 2007).

## 2 Ansätze zur Therapie von retinalen Dystrophien

Die Gensatztherapie mittels rAAV-Vektoren ist eine sehr viel versprechende Methode, um autosomal-rezessive okuläre Erkrankungen zu behandeln. In den letzten Jahren wurden auf der Grundlage von rAAV-Vektoren zahlreiche retinale Gentransfers in Tiermodellen für Retinitis pigmentosa durchgeführt (den Hollander et al., 2010; Smith et al., 2012) (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Auf rAAV-Vektoren basierende Gentherapiestudien für autosomal-rezessive fotororezeptor-spezifische Gene, die Retinitis pigmentosa auslösen**

| Gen    | Gen Referenz                            | Tiermodell | Gentherapie Referenz   |
|--------|---|------------|--|
| GUCY2d | (Dizhoor et al., 1994)                  | Maus       | (Boye et al., 2010; Boye et al., 2011)   |
| MFRP   | (Katoh, 2001)                           | Maus       | (Dinculescu et al., 2012)  |
| PDE6B  | (Baehr et al., 1979; Fung et al., 1990) | Maus, Hund | (Allocca et al., 2011; Bennett et al., 1996; Jomary et al., 1997; Pang et al., 2008a; Pang et al., 2011; Petit et al., 2012) |
| PDE6A  | (Baehr et al., 1979; Fung et al., 1990) | Maus       | (Wert et al., 2012)  |
| RHO    | (Humphries et al., 1997)                | Maus       | (Palfi et al., 2010)   |

Voraussetzung für die Gentherapie einer rezessiv-genetischen retinalen Erkrankung ist, dass das mutierte krankheitsauslösende Gen bekannt ist. Natürlich sollte die Therapie so früh wie möglich erfolgen, das heißt bevor die Fotorezeptoren zerstört sind.

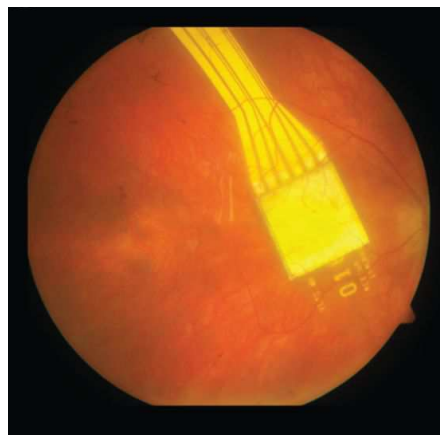
Für die Therapie von autosomal-dominanten retinalen Erkrankungen gelten die gleichen Voraussetzungen; allerdings ist das Vorgehen komplizierter. Zunächst muss die Aktivität des mutierten Gens, das in einer fehlerhaften Funktion oder zelltoxischen Eigenschaften resultiert, mittels therapeutischer RNA-Interferenzen oder Ribozymen herunterreguliert werden. Zusätzlich erfolgt dann ein Gensatz, um das korrekte Protein zu produzieren (Rossmiller et al., 2012)

Bei degenerativen Netzhauterkrankungen, deren krankheitsverursachendes Gen unbekannt ist, wird die Expression von neuroprotektiven Faktoren untersucht. Die Idee, die ursprünglich aus der Neurologie stammt und für Patienten mit Morbus Parkinson oder Multipler Sklerose konzipiert wurde, beruht auf dem Versuch, Nervenzellen durch pharmakologische Substanzen vor dem Absterben zu bewahren. Für einige Proteine, zum Beispiel den basic fibroblast-derived growth factor (bFGF), den brain-derived neurotrophic factor (BDNF) oder den ciliary neurotrophic factor (CNTF), konnte bereits ein positiver neuroprotektiver Einfluss im Krankheitsverlauf der Retinitis pigmentosa im *in vitro*- beziehungsweise *in vivo*-Tiermodell erwiesen werden (Chaum, 2003; LaVail et al., 1998; Wen et al., 2012). Das Ziel der Neuroprotektion besteht darin, durch eine subretinale oder intravitreale Injektion dieser Proteine sowohl die Außensegmente der Fotorezeptoren als auch die Schichtdicke der äußeren Körnerschicht über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Trotz positiver Effekte auf die Morphologie verbesserte sich allerdings in vielen Studien die Funktion der Fotorezeptoren nicht (Lau et al., 2000; Liang et al., 2001; Schlichtenbrede et al., 2003). In einer klinischen Studie mit zehn Retinitis pigmentosa-Patienten, denen CNTF-freisetzende Kapseln in den Glaskörper implantiert wurden, konnte bei den meisten die Sehfähigkeit stabilisiert oder verbessert werden (Sieving et al., 2006). Weitere Studien sind allerdings nötig, um unter anderem den Mechanismus der Neuroprotektion sowie die optimale Dosierung der Wirkstoffe zu klären.

Im Falle eines bereits erfolgten massiven Fotorezeptoruntergangs oder einer klinisch manifesten Erblindung des Patienten, ist eine Behandlung mittels eines rAAV-vermittelten Gentransfers oder neuroprotektiver Substanzen nicht mehr möglich. Für diese Patienten gibt es allerdings alternative Therapieansätze, die zukünftig in diesem fortgeschrittenen Stadium der Degeneration helfen könnten, zum Beispiel die Implantation elektronischer Sehchips, die Transplantation von Zellen oder das Einbringen von genetisch kodierten lichtsensitiven Ionenkanälen.

Bei der Implantation elektronischer Sehchips wurden bislang drei verschiedene Ansätze entwickelt, die auf die Ursache der Erblindung abgestimmt sind: die elektrische Stimulation der Sehrinde, des Sehnervs oder der Netzhaut (Zrenner, 2002). Das derzeit am weitesten entwickelte visuelle Implantat ist das subretinale Netzhautimplantat (Abb. 32). Bei diesem Ansatz wird ein elektronischer Sehchip operativ so auf der Netzhaut positioniert, dass dieser in der Ebene der degenerierten Fotorezeptoren liegt und an die nachgeschalteten Neuronen ankopeln kann. Der elektronische Sehchip ist ein Silikonplättchen mit einem Array von Tausenden

lichtempfindlicher Mikrofotodioden. Jede Mikrofotodiode ist mit einer Elektrode versehen, welche die Bipolar- und Ganglienzellen stimuliert (Chow and Peachey, 1998; Zrenner et al., 1997). Im Unterschied zu den natürlichen Fotorezeptoren reicht jedoch die Energie des einfallenden Lichtes nicht aus, um die nachgeschalteten Bipolarzellen ausreichend elektrisch zu stimulieren. Deshalb benötigen die subretinalen Implantate eine externe Stromversorgung durch ein Kabel, das in einer Empfangsspule hinter dem Ohr mündet (Gekeler and Zrenner, 2005). Nach erfolgreichen Tierversuchen wurden derartige Implantate bei 20 blinden Patienten implantiert. Nach der Implantation konnten einige der zuvor vollständig blinden Patienten erstmals wieder Seheindrücke wahrnehmen – sie bemerkten schemenhafte Umrisse sehen und unterschieden Hell-Dunkel-Kontraste (Zrenner et al., 2011). Eine weitere klinische Studie erwies, dass die Silikonplättchen über Jahre sehr gut vertragen wurden: Es kam weder zu Entzündungen noch zu Abstoßreaktionen, Blutungen oder Netzhautablösungen (Chow et al., 2010). Es ist allerdings fraglich, inwiefern die Elektronik über Jahre stabil bleibt. Ein weiteres großes Problem besteht darin, die Elektroden dauerhaft und schädigungsfrei an das neuronale Gewebe anzukoppeln. Auch ist noch unklar, inwieweit man die Nervenzellen über einen längeren Zeitraum reizen kann, ohne dass diese geschädigt werden. Es wird sich zeigen, in welchem Umfang derartige Sehchips langfristig zu einem brauchbaren Sehvermögen führen.



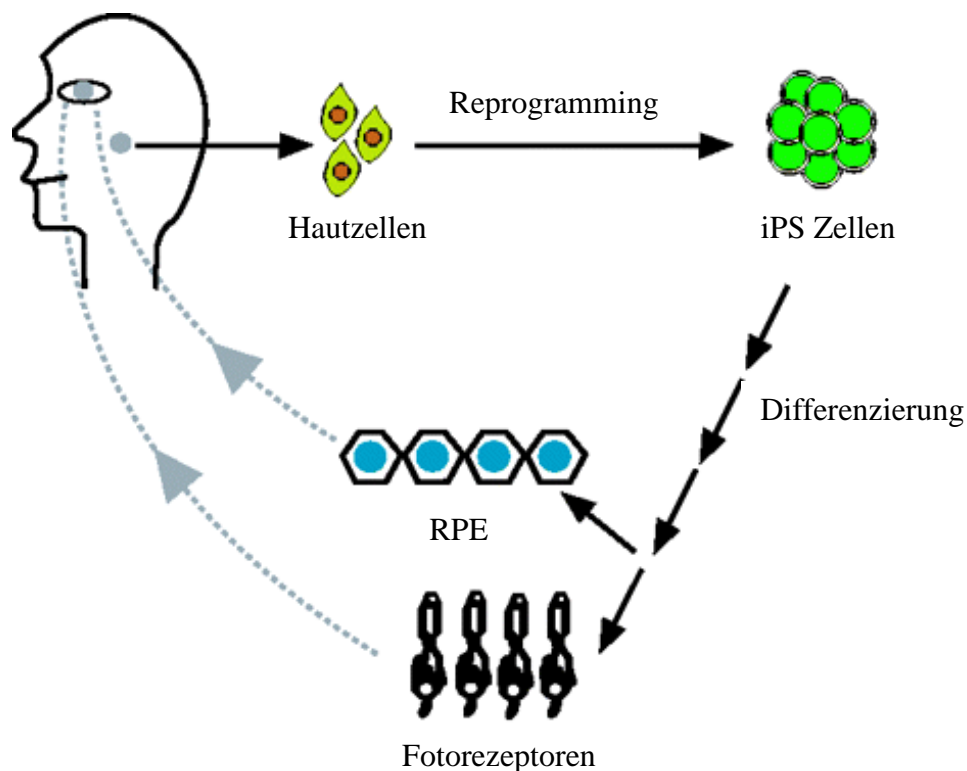
**Abb. 32: Augenhintergrund eines Retinitis pigmentosa-Patienten mit einem subretinalen Implantat.** Das subretinale Implantat wird unter die Netzhaut transplantiert. Es ist ein Silikonplättchen, auf dem sich Tausende Mikrofotodioden befinden, welche die abgestorbenen Fotorezeptoren ersetzen sollen. Modifiziert nach (Stingl et al., 2013).

Beim optogenetischen Ansatz werden Gene, die für lichtensitive Ionenkanäle oder –pumpen kodieren, mittels viraler Vektoren in die überlebenden Netzhautzellen eingebracht, um sie (wieder) lichtsensitiv zu machen (Busskamp et al., 2012). Grundlage dieser Therapie war das von Nagel et al. entdeckte lichtensitive Protein Channelrhodopsins2 (Nagel et al., 2003). Channelrhodopsin2 ist ein Kationenkanal aus Grünalgen, der sich nach Anregung durch blau-

es Licht öffnet und im physiologischen Ionenmilieu einen depolarisierenden Strom leitet (Nagel et al., 2003). Durch neuronale Expression von Channelrhodopsin2 können diese Neurone lichtabhängig depolarisiert und somit stimuliert werden. Wenig später wurde Halorhodopsin entdeckt, eine Chloridpumpe, welche die Nervenzellen nach Bestrahlung mit gelbem Licht hyperpolarisiert (Han and Boyden, 2007; Zhang et al., 2007). Channelrhodopsin2 und Halorhodopsin bilden somit zwei antagonistisch wirkende Partner, die man zur präzisen Stimulation oder Inhibition von Nervenzellen einsetzen kann. Es gibt bereits mehrere Versuche an blinden Mäusen, bei denen in den Fotorezeptoren nachgeschaltete Zellen Channelrhodopsin2 und/ oder Halorhodopsin eingebracht wurde, so dass die Mäuse ihre Lichtempfindlichkeit zurückerlangten (Bi et al., 2006; Busskamp et al., 2010; Greenberg et al., 2011; Lagali et al., 2008; Zhang et al., 2009). Ob das Gehirn daraus allerdings ein sinnvolles Bild zusammensetzt, ist noch unklar, da die Verarbeitung der lichtabhängigen Signale durch das retinale Netzwerk vollständig fehlt. Zudem ist die Lichtempfindlichkeit der Licht-gesteuerten Ionenkanäle sehr gering; die Patienten bräuchten eine Spezialbrille, die Bilder, die sehr viel heller als die natürliche Umgebung sind, projiziert. Auch Änderungen der Lichtintensität sind kaum aufzulösen. Des Weiteren muss die Sicherheit der Expression der optogenetischen Sensoren vor Beginn einer Behandlung geklärt werden (Busskamp et al., 2012). Als Voraussetzung für eine klinische Studie dieses Therapieansatzes am Menschen sind deshalb noch weitere präklinische Untersuchungen erforderlich.

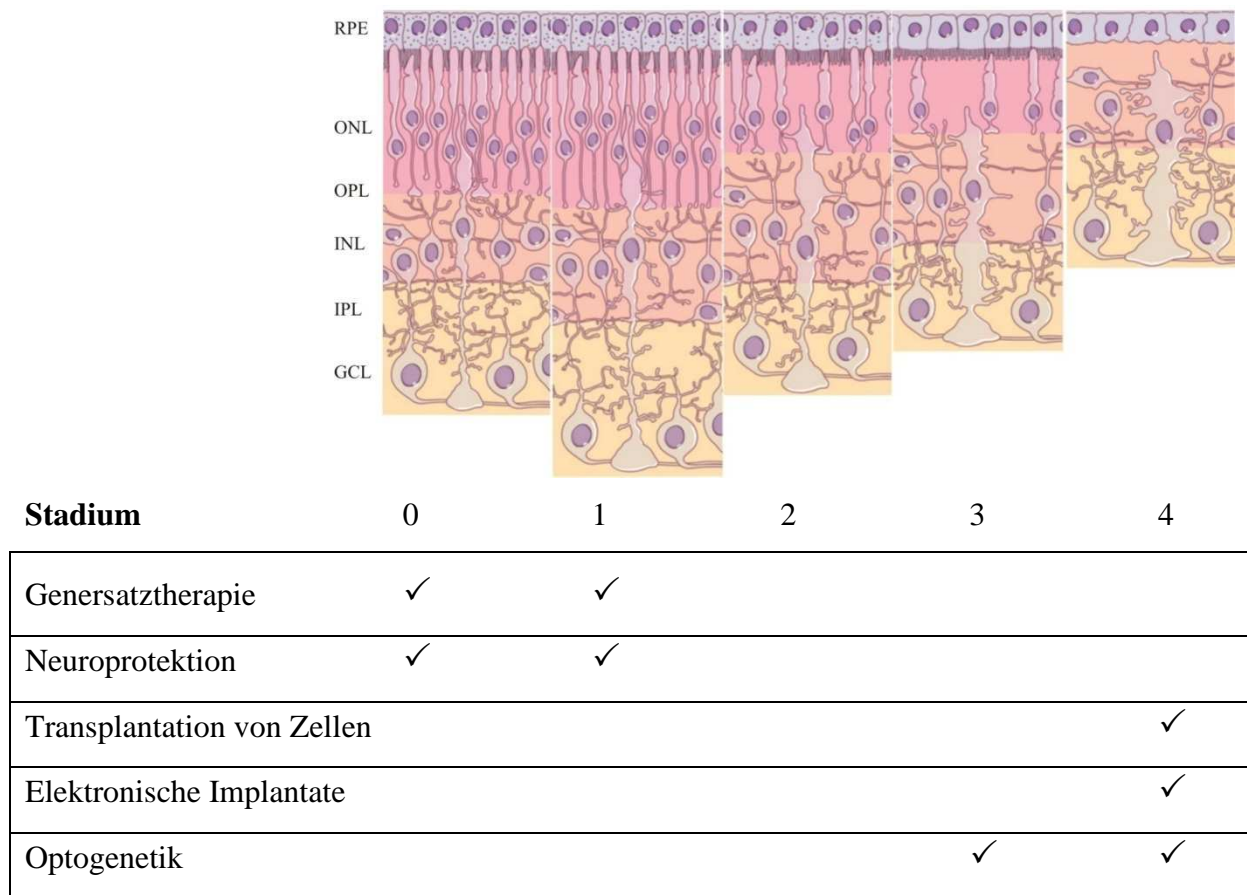
Ein weiterer Therapieansatz für Retinitis pigmentosa, der zur Zeit im Mausmodell erforscht wird, ist die Transplantation von Zellen; diese sollen bei bereits fortgeschrittener Degeneration die untergegangenen Fotorezeptoren ersetzen. Die transplantierten Zellen müssen sich an die korrekte Stelle der Netzhaut integrieren und eine ähnliche Funktionalität wie die gesunden Zellen entwickeln. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Transplantation in der Regel keine Schäden und keine Abstoßreaktionen hervorruft. Es wurden bereits verschiedene Zellarten transplantiert, zum Beispiel fetale retinale Vorläuferzellen (Barber et al., 2013; MacLaren et al., 2006; Singh et al., 2013), embryonale Stammzellen (Singh and MacLaren, 2011) oder induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) (Boucherie et al., 2011; Li et al., 2012). Nach der Transplantation von retinalen Vorläuferzellen in die Retina blinder Mäuse wurden diese in die äußere Körnerschicht integriert und entwickelten eine Stäbchen-ähnliche Morphologie. Die therapierten Mäuse nahmen schwaches Licht besser wahr als die Kontrollgruppe. Allerdings fehlt ein Nachweis der Funktionalität der Stäbchen mittels Elektroretinographie (Singh et al., 2013). Ob das Verfahren je beim Menschen angewendet werden kann, ist frag-

lich: Die benötigte Vorläuferzellen finden sich beim Menschen nur im zweiten Schwangerschaftsdrittel und sind somit praktisch unzugänglich (Reh, 2006). Auch die Verwendung von embryonalen Stammzellen ist vorerst auf Grund ethischer Bedenken eingeschränkt. Die Verwendung von iPS-Zellen, die durch künstliche Reprogrammierung aus Hautzellen entstehen, ist dagegen ethisch unbedenklich. Diese können durch die Expression von speziellen Transkriptionsfaktoren in retinales Pigmentepithel oder Fotorezeptoren differenziert werden (Wang, 2009) (Abb. 33 ). Allerdings ist die Differenzierung noch nicht ausreichend erforscht, ebenso wie das eventuell erhöhte Risiko für die Entstehung von Tumoren.



**Abb. 33: Transplantation von iPS-Zellen.** iPS-Zellen werden durch Reprogrammierung aus Hautzellen hergestellt und anschließend in retinales Pigmentepithel (RPE) oder Fotorezeptoren differenziert. Modifiziert nach (Wang, 2009).

Die verschiedenen Therapieansätze und deren möglicher Behandlungszeitpunkt sind in Abb. 34 zusammengefasst.



**Abb. 34: Therapiemöglichkeiten für unterschiedliche Zeitpunkte der Stadien der Degeneration von Retinitis pigmentosa.** Je nach Therapieansatz muss der Zeitpunkt der Therapie in Abhängigkeit von der Degeneration der Fotorezeptoren gewählt werden. Ein Haken (✓) bedeutet Erfolg versprechend. Die Behandlung von Retinitis pigmentosa mittels Genersatztherapie oder Neuroprotektion müsste zu einem sehr frühen Zeitpunkt (Stadium 1 oder 2) stattfinden, das heißt vor Absterben der Fotorezeptoren. Die Netzhauttransplantation oder die Implantation eines elektronischen Sehchips wäre dagegen zu einem späten Zeitpunkt möglich (Stadium 4). Auch beim optogenetische Ansatz, der versucht, mit Hilfe von lichtsensitiven Kanälen die Lichtempfindlichkeit wiederherzustellen, wäre ein später Therapiebeginn (Stadium 3 oder 4) möglich. RPE, retinales Pigmentepithel; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. Modifiziert nach (Jacobson and Cideciyan, 2010).

### 3 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stellen einen Meilenstein auf dem Weg zur klinischen Umsetzung einer Genersatztherapie von Retinitis pigmentosa beim Menschen dar. In einem nächsten Schritt könnte die beschriebene Strategie an einem Hundemodell getestet werden – vor kurzem wurde ein Hundemodell etabliert, das eine Mutation im CNGB1-Gen trägt (Petersen-Jones et al., 2013, ARVO Abstract 684-D0206).

Die Genersatztherapie würde auch für andere autosomal-rezessive retinale Erkrankungen eine Behandlung ermöglichen. Für Achromatopsie, ausgelöst durch eine Mutation im CNGA3-Gen, wurden im Mausmodell ebenfalls vielversprechende Ergebnisse erzielt (Michalakis et al., 2010). Der entscheidende nächste Schritt ist die erfolgreiche Umsetzung der Therapie am Menschen. Gemeinsam mit der Augenklinik Tübingen verfolgt unsere Arbeitsgruppe dieses wichtige Ziel. Innerhalb der folgenden fünf Jahre soll die Translation gentherapeutischer Ansätze für Achromatopsie und Retinitis pigmentosa realisiert werden.

Es gibt bereits mehrere klinische Studien am Menschen zur Therapie der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) mittels rAAV-Vektoren. LCA ist eine angeborene Funktionsstörung des retinalen Pigmentepithels, die durch eine Mutation im RPE65-Gen ausgelöst werden kann. Auch hier wurden vor den klinischen Studien am Menschen Untersuchungen an RPE65-defizienten Mäusen und am Hundemodell durchgeführt (Acland et al., 2005; Acland et al., 2001; Bennicelli et al., 2008; Le Meur et al., 2007; Mowat et al., 2012; Pang et al., 2006). Als weitere Voraussetzung für eine klinische Studie am Menschen musste die Sicherheit der Behandlung sowie die fehlende Immunantwort an Hunden und Affen belegt werden (Jacobson et al., 2006a; Jacobson et al., 2006b). Drei unabhängige klinische Studien erwiesen schließlich, dass die Patienten den Netzhauteingriff gut und ohne Nebenwirkungen vertrugen. Langzeitstudien bestätigen die Sicherheit der Behandlung (Cideciyan et al., 2013; Jacobson et al., 2012). Einige der Patienten berichten sogar über subjektive Verbesserungen der Lichtempfindlichkeit; elektroretinographische Messungen blieben bisher jedoch unterhalb der Nachweisgrenze (Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Hauswirth et al., 2008).

Die bisherigen Therapieerfolge, die im Tiermodell und in klinischen Studien am Menschen erzielt wurden, geben berechtigten Anlass zur Hoffnung, dass in naher Zukunft betroffene Patienten therapiert werden können.



## **VI Zusammenfassung**

Retinitis pigmentosa ist eine bisher unheilbare degenerative Netzhauterkrankung, die zu schweren Sehstörungen, und nach einem progredienten Verlauf häufig zur Erblindung führt. Die erbliche Erkrankung kann durch Mutationen im CNGB1-Gen ausgelöst werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand CNGB1-defizienter Mäuse, einem präklinischen Modell für Retinitis pigmentosa, eine virale Gensatztherapie entwickelt werden. Ziel war, das Sehvermögen der nachtblinden Mäuse in vollem Umfang wiederherzustellen und die voranschreitende Degeneration der Retina zu verlangsamen.

Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAVs) wurden als Genfähren verwendet, um eine korrekte Kopie des CNGB1-Gens in die Stäbchen einzuschleusen. Nach Injektion dieser „therapeutischen“ rAAV-Vektoren unter die Retina von zwei Wochen alten CNGB1-defizienten Mäusen wurde der Erfolg der Gensatztherapie auf zellulärer, histologischer und funktioneller Ebene untersucht. Auf Proteinebene ließ sich das CNGB1-Protein bereits 40 Tage nach der Injektion nachweisen. Der native heterotetramere Kanalkomplex, bestehend aus drei CNGA1- und einer CNGB1-Untereinheit, wurde an der richtigen Stelle – in den Außensegmenten der Stäbchen – exprimiert. Die Funktionalität des Zyklonukleotid-aktivierten (cyclic nucleotide-gated, CNG) Ionenkanals wurde zunächst in Elektroretinogramm-Ableitungen nachgewiesen. Diese zeigten, dass die Stäbchen erstmals auf Lichtreize antworten. Ein Sehtest bewies anschließend, dass die Stäbchen-vermittelten Signale im Gehirn korrekt verarbeitet wurden und die ursprünglich von Geburt an nachtblinden Mäuse bei niedrigen Lichtintensitäten sehen konnten. Langzeitexperimente belegten zudem die Nachhaltigkeit des Therapieansatzes: Ein Jahr nach der Behandlung war das Absterben der Fotorezeptoren deutlich verlangsamt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die einmalige Injektion der „therapeutischen“ rAAV-Vektoren ausreicht, um den genetischen Defekt zu kompensieren und effektiv die progrediente Degeneration der Retina zu verlangsamen.

Der Therapieerfolg, der im präklinischen CNGB1-defizienten Mausmodell erzielt wurde, ist ein erster, sehr viel versprechender Schritt auf dem Weg zu einer klinischen Behandlung von Menschen mit Retinitis pigmentosa.

## VII Referenzen

- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Bennett, J., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Bennicelli, J., Dejneka, N.S., Pearce-Kelling, S.E., Maguire, A.M., Palczewski, K., *et al.* (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12, 1072-1082.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., *et al.* (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature genetics* 28, 92-95.
- Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H., and Kay, M.A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of virology* 80, 9831-9836.
- Ali, R.R., Reichel, M.B., Thrasher, A.J., Levinsky, R.J., Kinnon, C., Kanuga, N., Hunt, D.M., and Bhattacharya, S.S. (1996). Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Human molecular genetics* 5, 591-594.
- Allocca, M., Manfredi, A., Iodice, C., Di Vicino, U., and Auricchio, A. (2011). AAV-mediated gene replacement, either alone or in combination with physical and pharmacological agents, results in partial and transient protection from photoreceptor degeneration associated with betaPDE deficiency. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 5713-5719.
- Allocca, M., Mussolino, C., Garcia-Hoyos, M., Sanges, D., Iodice, C., Petrillo, M., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., Marigo, V., Surace, E.M., *et al.* (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *Journal of virology* 81, 11372-11380.
- Ardell, M.D., Bedsole, D.L., Schoborg, R.V., and Pittler, S.J. (2000). Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene. *Gene* 245, 311-318.
- Arikawa, K., Molday, L.L., Molday, R.S., and Williams, D.S. (1992). Localization of peripherin/rds in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration. *The Journal of cell biology* 116, 659-667.
- Arshavsky, V.Y., and Burns, M.E. (2012). Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. *The Journal of biological chemistry* 287, 1620-1626.
- Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *Journal of virology* 80, 8961-8969.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754-756.
- Audo, I., Manes, G., Mohand-Said, S., Friedrich, A., Lancelot, M.E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Poch, O., Zanlonghi, X., Hamel, C.P., *et al.* (2010). Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 3687-3700.
- Axel, R. (2005). Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 6110-6127.
- Baehr, W., Devlin, M.J., and Applebury, M.L. (1979). Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments. *The Journal of biological chemistry* 254, 11669-11677.
- Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., *et al.* (2008). Effect of gene

- therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 358, 2231-2239.
- Barber, A.C., Hippert, C., Duran, Y., West, E.L., Bainbridge, J.W., Warre-Cornish, K., Luhmann, U.F., Lakowski, J., Sowden, J.C., Ali, R.R., *et al.* (2013). Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 354-359.
- Bareil, C., Hamel, C.P., Delague, V., Arnaud, B., Demaille, J., and Claustres, M. (2001). Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 108, 328-334.
- Bartlett, J.S., Samulski, R.J., and McCown, T.J. (1998). Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Human gene therapy* 9, 1181-1186.
- Bartlett, J.S., Wilcher, R., and Samulski, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 74, 2777-2785.
- Bennett, J., Chung, D.C., and Maguire, A. (2012). Gene delivery to the retina: from mouse to man. *Methods in enzymology* 507, 255-274.
- Bennett, J., Maguire, A.M., Cideciyan, A.V., Schnell, M., Glover, E., Anand, V., Aleman, T.S., Chirmule, N., Gupta, A.R., Huang, Y., *et al.* (1999). Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9920-9925.
- Bennett, J., Tanabe, T., Sun, D., Zeng, Y., Kjeldbye, H., Gouras, P., and Maguire, A.M. (1996). Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nature medicine* 2, 649-654.
- Bennicelli, J., Wright, J.F., Komaromy, A., Jacobs, J.B., Hauck, B., Zeleniaia, O., Mingozzi, F., Hui, D., Chung, D., Rex, T.S., *et al.* (2008). Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 458-465.
- Berns, K.I., and Giraud, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Current topics in microbiology and immunology* 218, 1-23.
- Berson, E.L. (1996). Retinitis pigmentosa: unfolding its mystery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4526-4528.
- Berson, E.L. (2007). Long-term visual prognoses in patients with retinitis pigmentosa: the Ludwig von Sallmann lecture. *Experimental eye research* 85, 7-14.
- Bi, A., Cui, J., Ma, Y.P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dizhoor, A.M., and Pan, Z.H. (2006). Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23-33.
- Biel, M., and Michalakakis, S. (2009). Cyclic nucleotide-gated channels. *Handbook of experimental pharmacology*, 111-136.
- Blankinship, M.J., Gregorevic, P., Allen, J.M., Harper, S.Q., Harper, H., Halbert, C.L., Miller, A.D., and Chamberlain, J.S. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 10, 671-678.
- Bönigk, W., Bradley, J., Muller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnett, G.V., Kaupp, U.B., and Frings, S. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 5332-5347.
- Boucherie, C., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2011). Induced pluripotent stem cell technology for generating photoreceptors. *Regenerative medicine* 6, 469-479.
- Boye, S.E., Boye, S.L., Pang, J., Ryals, R., Everhart, D., Umino, Y., Neeley, A.W., Besharse, J., Barlow, R., and Hauswirth, W.W. (2010). Functional and behavioral restoration of

- vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse. *PloS one* 5, e11306.
- Boye, S.L., Conlon, T., Erger, K., Ryals, R., Neeley, A., Cossette, T., Pang, J., Dyka, F.M., Hauswirth, W.W., and Boye, S.E. (2011). Long-term preservation of cone photoreceptors and restoration of cone function by gene therapy in the guanylate cyclase-1 knockout (GC1KO) mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 7098-7108.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., and Reichenbach, A. (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research* 25, 397-424.
- Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6, E72-92.
- Buch, P.K., Bainbridge, J.W., and Ali, R.R. (2008). AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man. *Gene therapy* 15, 849-857.
- Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D., and Rose, J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *Journal of virology* 40, 241-247.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadts-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The journal of gene medicine* 10, 717-733.
- Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siebert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M., *et al.* (2010). Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329, 413-417.
- Busskamp, V., Picaud, S., Sahel, J.A., and Roska, B. (2012). Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. *Gene therapy* 19, 169-175.
- Cao, H., Molday, R.S., and Hu, J. (2011). Gene therapy: light is finally in the tunnel. *Protein & cell* 2, 973-989.
- Caspi, R.R. (2006). Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunological reviews* 213, 23-35.
- Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R.J., and Walsh, C.E. (2000). Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2, 619-623.
- Cham, E. (2003). Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *Journal of cellular biochemistry* 88, 57-75.
- Chen, T.Y., Illing, M., Molday, L.L., Hsu, Y.T., Yau, K.W., and Molday, R.S. (1994). Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca(2+)-calmodulin modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11757-11761.
- Chen, T.Y., Peng, Y.W., Dhallan, R.S., Ahamed, B., Reed, R.R., and Yau, K.W. (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362, 764-767.
- Chow, A.Y., Bittner, A.K., and Pardue, M.T. (2010). The artificial silicon retina in retinitis pigmentosa patients (an American Ophthalmological Association thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society* 108, 120-154.
- Chow, A.Y., and Peachey, N.S. (1998). The subretinal microphotodiode array retinal prosthesis. *Ophthalmic research* 30, 195-198.
- Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M., *et al.* (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod

- kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15112-15117.
- Cideciyan, A.V., Jacobson, S.G., Beltran, W.A., Sumaroka, A., Swider, M., Iwabe, S., Roman, A.J., Olivares, M.B., Schwartz, S.B., Komaromy, A.M., *et al.* (2013). Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E517-525.
- Connell, G., Bascom, R., Molday, L., Reid, D., McInnes, R.R., and Molday, R.S. (1991). Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 723-726.
- Coura Rdos, S., and Nardi, N.B. (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology journal* 4, 99.
- Cronin, T., Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2007). Retinal degenerations: from cell signaling to cell therapy; pre-clinical and clinical issues. *Current gene therapy* 7, 121-129.
- Daiger, S.P., Bowne, S.J., and Sullivan, L.S. (2007). Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 125, 151-158.
- Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A., and Chiorini, J.A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3428-3432.
- Daya, S., and Berns, K.I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21, 583-593.
- den Hollander, A.I., Black, A., Bennett, J., and Cremers, F.P. (2010). Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 120, 3042-3053.
- Dinculescu, A., Estreicher, J., Zenteno, J.C., Aleman, T.S., Schwartz, S.B., Huang, W.C., Roman, A.J., Sumaroka, A., Li, Q., Deng, W.T., *et al.* (2012). Gene therapy for retinitis pigmentosa caused by MFRP mutations: human phenotype and preliminary proof of concept. *Human gene therapy* 23, 367-376.
- Dinculescu, A., Glushakova, L., Min, S.H., and Hauswirth, W.W. (2005). Adeno-associated virus-vectored gene therapy for retinal disease. *Human gene therapy* 16, 649-663.
- Dizhoor, A.M., Lowe, D.G., Olshevskaya, E.V., Laura, R.P., and Hurley, J.B. (1994). The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 12, 1345-1352.
- Dong, B.A., Nakai, H., and Xiao, W.D. (2010). Characterization of Genome Integrity for Oversized Recombinant AAV Vector. *Molecular Therapy* 18, 87-92.
- Dryja, T.P., Finn, J.T., Peng, Y.W., McGee, T.L., Berson, E.L., and Yau, K.W. (1995). Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10177-10181.
- Dryja, T.P., Hahn, L.B., Cowley, G.S., McGee, T.L., and Berson, E.L. (1991). Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9370-9374.
- Dryja, T.P., Rucinski, D.E., Chen, S.H., and Berson, E.L. (1999). Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 40, 1859-1865.

- Farber, D.B., and Lolley, R.N. (1974). Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 186, 449-451.
- Fariss, R.N., Li, Z.Y., and Milam, A.H. (2000). Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 129, 215-223.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F.S., and Parmeggiani, F. (2011). Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics* 12, 238-249.
- Fischer, M.D., Huber, G., Beck, S.C., Tanimoto, N., Muehlfriedel, R., Fahl, E., Grimm, C., Wenzel, A., Reme, C.E., van de Pavert, S.A., *et al.* (2009). Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. *PloS one* 4, e7507.
- Flannery, J.G., Zolotukhin, S., Vaquero, M.I., LaVail, M.M., Muzyczka, N., and Hauswirth, W.W. (1997). Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6916-6921.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature biotechnology* 27, 59-65.
- Fujimoto, J.G. (2003). Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. *Nature biotechnology* 21, 1361-1367.
- Fung, B.K., Young, J.H., Yamane, H.K., and Griswold-Prenner, I. (1990). Subunit stoichiometry of retinal rod cGMP phosphodiesterase. *Biochemistry* 29, 2657-2664.
- Gekeler, F., and Zrenner, E. (2005). [Status of the subretinal implant project. An overview]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 102, 941-949.
- Gilliam, J.C., Chang, J.T., Sandoval, I.M., Zhang, Y., Li, T., Pittler, S.J., Chiu, W., and Wensel, T.G. (2012). Three-dimensional architecture of the rod sensory cilium and its disruption in retinal neurodegeneration. *Cell* 151, 1029-1041.
- Glushakova, L.G., Lisankie, M.J., Eruslanov, E.B., Ojano-Dirain, C., Zolotukhin, I., Liu, C., Srivastava, A., and Stacpoole, P.W. (2009). AAV3-mediated transfer and expression of the pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit gene causes metabolic remodeling and apoptosis of human liver cancer cells. *Molecular genetics and metabolism* 98, 289-299.
- Greenberg, K.P., Pham, A., and Werblin, F.S. (2011). Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism. *Neuron* 69, 713-720.
- Grieger, J.C., Choi, V.W., and Samulski, R.J. (2006). Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nature protocols* 1, 1412-1428.
- Halbert, C.L., Allen, J.M., and Miller, A.D. (2001). Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *Journal of virology* 75, 6615-6624.
- Hallek, M., Girod, A., Braun-Falco, M., Wendtner, C.M., Bogedain, C., and Horer, M. (1998). Recombinant adeno-associated virus vectors. *IDrugs : the investigational drugs journal* 1, 561-573.
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1, 40.
- Han, X., and Boyden, E.S. (2007). Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PloS one* 2, e299.
- Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-1809.
- Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., *et al.* (2008). Treatment of leber

- congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Human gene therapy* 19, 979-990.
- Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 6466-6470.
- Humphries, M.M., Rancourt, D., Farrar, G.J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R.A., Sieving, P.A., Sheils, D.M., McNally, N., Creighton, P., *et al.* (1997). Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nature genetics* 15, 216-219.
- Hüttl, S., Michalakakis, S., Seeliger, M., Luo, D.G., Acar, N., Geiger, H., Hudl, K., Mader, R., Haverkamp, S., Moser, M., *et al.* (2005). Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 130-138.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., McTiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 45-53.
- Jacobson, S.G., Acland, G.M., Aguirre, G.D., Aleman, T.S., Schwartz, S.B., Cideciyan, A.V., Zeiss, C.J., Komaromy, A.M., Kaushal, S., Roman, A.J., *et al.* (2006a). Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 1074-1084.
- Jacobson, S.G., Boye, S.L., Aleman, T.S., Conlon, T.J., Zeiss, C.J., Roman, A.J., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Komaromy, A.M., Doobrajh, M., *et al.* (2006b). Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Human gene therapy* 17, 845-858.
- Jacobson, S.G., and Cideciyan, A.V. (2010). Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. *The New England journal of medicine* 363, 1669-1671.
- Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Ratnakaram, R., Heon, E., Schwartz, S.B., Roman, A.J., Peden, M.C., Aleman, T.S., Boye, S.L., Sumaroka, A., *et al.* (2012). Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives of ophthalmology* 130, 9-24.
- Jenkins, P.M., Hurd, T.W., Zhang, L., McEwen, D.P., Brown, R.L., Margolis, B., Verhey, K.J., and Martens, J.R. (2006). Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17. *Current biology : CB* 16, 1211-1216.
- Johnson, J.S., and Samulski, R.J. (2009). Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *Journal of virology* 83, 2632-2644.
- Jomary, C., Vincent, K.A., Grist, J., Neal, M.J., and Jones, S.E. (1997). Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene therapy* 4, 683-690.
- Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., and Daida, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Journal of virology* 79, 609-614.
- Katoh, M. (2001). Molecular cloning and characterization of MFRP, a novel gene encoding a membrane-type Frizzled-related protein. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 116-123.

- Kellner, U., Kellner, S., Renner, A.B., Fiebig, B.S., Weinitz, S., and Weber, B.H. (2009). [Evidence-based diagnostic approach to inherited retinal dystrophies 2009]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 226, 999-1011.
- Kizhatil, K., Baker, S.A., Arshavsky, V.Y., and Bennett, V. (2009). Ankyrin-G promotes cyclic nucleotide-gated channel transport to rod photoreceptor sensory cilia. *Science* 323, 1614-1617.
- Köberl, D.D., Alexander, I.E., Halbert, C.L., Russell, D.W., and Miller, A.D. (1997). Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1426-1431.
- Kohl, S., and Biskup, S. (2012). [Genetic Diagnostic Testing in Inherited Retinal Dystrophies.]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*.
- Kondo, H., Qin, M., Mizota, A., Kondo, M., Hayashi, H., Hayashi, K., Oshima, K., and Tahira, T. (2004). A homozygosity-based search for mutations in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa, using microsatellite markers. *Investigative ophthalmology & visual science* 45, 4433-4439.
- König, R. (2003). Bardet-Biedl syndrome and Usher syndrome. *Developments in ophthalmology* 37, 126-140.
- Körschen, H.G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Muller, F., Dose, A., Godde, M., *et al.* (1995). A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* 15, 627-636.
- Krizaj, D., and Copenhagen, D.R. (2002). Calcium regulation in photoreceptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, d2023-2044.
- Lagali, P.S., Balya, D., Awatramani, G.B., Munch, T.A., Kim, D.S., Busskamp, V., Cepko, C.L., and Roska, B. (2008). Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nature neuroscience* 11, 667-675.
- Lai, Y., Yue, Y.P., and Duan, D.S. (2010). Evidence for the Failure of Adeno-associated Virus Serotype 5 to Package a Viral Genome >= 8.2kb. *Molecular Therapy* 18, 75-79.
- Lau, D., McGee, L.H., Zhou, S., Rendahl, K.G., Manning, W.C., Escobedo, J.A., and Flannery, J.G. (2000). Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Investigative ophthalmology & visual science* 41, 3622-3633.
- LaVail, M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C.H., and Steinberg, R.H. (1998). Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Investigative ophthalmology & visual science* 39, 592-602.
- Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Pereon, Y., Cherel, Y., *et al.* (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene therapy* 14, 292-303.
- Leberherz, C., Maguire, A., Tang, W., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2008). Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *The journal of gene medicine* 10, 375-382.
- Li, A., Lane, W.S., Johnson, L.V., Chader, G.J., and Tombran-Tink, J. (1995a). Neuron-specific enolase: a neuronal survival factor in the retinal extracellular matrix? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 385-393.
- Li, Y., Tsai, Y.T., Hsu, C.W., Erol, D., Yang, J., Wu, W.H., Davis, R.J., Egli, D., and Tsang, S.H. (2012). Long-term Safety and Efficacy of Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPS) Grafts in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Molecular medicine* 18, 1312-1319.



- Li, Z.Y., Possin, D.E., and Milam, A.H. (1995b). Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 102, 805-816.
- Liang, F.Q., Aleman, T.S., Dejneka, N.S., Dudus, L., Fisher, K.J., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., and Bennett, J. (2001). Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 4, 461-472.
- Linden, R.M., and Berns, K.I. (2000). Molecular biology of adeno-associated viruses. *Contributions to microbiology* 4, 68-84.
- Loiler, S.A., Tang, Q., Clarke, T., Campbell-Thompson, M.L., Chiodo, V., Hauswirth, W., Cruz, P., Perret-Gentil, M., Atkinson, M.A., Ramiya, V.K., *et al.* (2005). Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12, 519-527.
- Luo, D.G., Xue, T., and Yau, K.W. (2008). How vision begins: an odyssey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9855-9862.
- MacLaren, R.E., Pearson, R.A., MacNeil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444, 203-207.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M.V., Thompson, A., Ozelo, M., *et al.* (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963-2972.
- Marigo, V. (2007). Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. *Cell cycle* 6, 652-655.
- Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Investigative ophthalmology & visual science* 53, 2921-2927.
- McKenna, K.C., and Kapp, J.A. (2004). Ocular immune privilege and CTL tolerance. *Immunol Res* 29, 103-112.
- McLaughlin, M.E., Ehrhart, T.L., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1995). Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3249-3253.
- Michalakis, S., Geiger, H., Haverkamp, S., Hofmann, F., Gerstner, A., and Biel, M. (2005). Impaired opsin targeting and cone photoreceptor migration in the retina of mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. *Investigative ophthalmology & visual science* 46, 1516-1524.
- Michalakis, S., Mühlfriedel, R., Tanimoto, N., Krishnamoorthy, V., Koch, S., Fischer, M.D., Becirovic, E., Bai, L., Huber, G., Beck, S.C., *et al.* (2010). Restoration of cone vision in the CNGA3-/- mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 2057-2063.
- Michalakis, S., Reisert, J., Geiger, H., Wetzel, C., Zong, X., Bradley, J., Spehr, M., Hüttl, S., Gerstner, A., Pfeifer, A., *et al.* (2006). Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary cyclic nucleotide-gated channel trapping. *The Journal of biological chemistry* 281, 35156-35166.
- Milam, A.H., Li, Z.Y., and Fariss, R.N. (1998). Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Progress in retinal and eye research* 17, 175-205.
- Molday, R.S., Molday, L.L., Dose, A., Clark-Lewis, I., Illing, M., Cook, N.J., Eismann, E., and Kaupp, U.B. (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell

- characterization and orientation of the amino terminus. *The Journal of biological chemistry* 266, 21917-21922.
- Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330, 375-383.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Mowat, F.M., Breuwer, A.R., Bartoe, J.T., Annear, M.J., Zhang, Z., Smith, A.J., Bainbridge, J.W., Petersen-Jones, S.M., and Ali, R.R. (2012). RPE65 gene therapy slows cone loss in Rpe65-deficient dogs. *Gene therapy*.
- Mühlfriedel, R., Michalakakis, S., Garrido, M.G., Biel, M., and Seeliger, M.W. (2013). Optimized technique for subretinal injections in mice. *Methods in molecular biology* 935, 343-349.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13940-13945.
- Nakai, H., Fuess, S., Storm, T.A., Muramatsu, S., Nara, Y., and Kay, M.A. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *Journal of virology* 79, 214-224.
- Nakazawa, M., Wada, Y., and Tamai, M. (1998). Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 116, 498-501.
- Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2011). Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell host & microbe* 10, 563-576.
- Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene therapy* 19, 649-658.
- Osten, P., Grinevich, V., and Cetin, A. (2007). Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handbook of experimental pharmacology*, 177-202.
- Palczewski, K., Sokal, I., and Baehr, W. (2004). Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 1123-1130.
- Palfi, A., Millington-Ward, S., Chadderton, N., O'Reilly, M., Goldmann, T., Humphries, M.M., Li, T., Wolfrum, U., Humphries, P., Kenna, P.F., *et al.* (2010). Adeno-associated virus-mediated rhodopsin replacement provides therapeutic benefit in mice with a targeted disruption of the rhodopsin gene. *Human gene therapy* 21, 311-323.
- Pan, Z., Lu, T., Zhang, X., Dai, H., Yan, W., Bai, F., and Li, Y. (2012). Identification of two mutations of the RHO gene in two Chinese families with retinitis pigmentosa: correlation between genotype and phenotype. *Molecular vision* 18, 3013-3020.
- Pang, J.J., Boye, S.L., Kumar, A., Dinculescu, A., Deng, W., Li, J., Li, Q., Rani, A., Foster, T.C., Chang, B., *et al.* (2008a). AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation. *Investigative ophthalmology & visual science* 49, 4278-4283.
- Pang, J.J., Chang, B., Kumar, A., Nusinowitz, S., Noorwez, S.M., Li, J., Rani, A., Foster, T.C., Chiodo, V.A., Doyle, T., *et al.* (2006). Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 565-572.
- Pang, J.J., Dai, X., Boye, S.E., Barone, I., Boye, S.L., Mao, S., Everhart, D., Dinculescu, A., Liu, L., Umino, Y., *et al.* (2011). Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis

- pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 234-242.
- Pang, J.J., Lauramore, A., Deng, W.T., Li, Q., Doyle, T.J., Chiodo, V., Li, J., and Hauswirth, W.W. (2008b). Comparative analysis of in vivo and in vitro AAV vector transduction in the neonatal mouse retina: effects of serotype and site of administration. *Vision research* 48, 377-385.
- Paquet-Durand, F., Beck, S., Michalakakis, S., Goldmann, T., Huber, G., Muhlfridel, R., Trifunovic, D., Fischer, M.D., Fahl, E., Duetsch, G., *et al.* (2011). A key role for cyclic nucleotide gated (CNG) channels in cGMP-related retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics* 20, 941-947.
- Paquet-Durand, F., Hauck, S.M., van Veen, T., Ueffing, M., and Ekstrom, P. (2009). PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *Journal of neurochemistry* 108, 796-810.
- Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.
- Petit, L., Lheriteau, E., Weber, M., Le Meur, G., Deschamps, J.Y., Provost, N., Mendes-Madeira, A., Libeau, L., Guihal, C., Colle, M.A., *et al.* (2012). Restoration of vision in the pde6beta-deficient dog, a large animal model of rod-cone dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 2019-2030.
- Petrs-Silva, H., Dinculescu, A., Li, Q., Deng, W.T., Pang, J.J., Min, S.H., Chiodo, V., Neeley, A.W., Govindasamy, L., Bennett, A., *et al.* (2011). Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 293-301.
- Petrs-Silva, H., Dinculescu, A., Li, Q., Min, S.H., Chiodo, V., Pang, J.J., Zhong, L., Zolotukhin, S., Srivastava, A., Lewin, A.S., *et al.* (2009). High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 463-471.
- Poetsch, A., Molday, L.L., and Molday, R.S. (2001). The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes. *The Journal of biological chemistry* 276, 48009-48016.
- Punzo, C., Kornacker, K., and Cepko, C.L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nature neuroscience* 12, 44-52.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature medicine* 5, 71-77.
- Quinn, K., Quirion, M.R., Lo, C.Y., Misplon, J.A., Epstein, S.L., and Chiorini, J.A. (2011). Intranasal administration of adeno-associated virus type 12 (AAV12) leads to transduction of the nasal epithelia and can initiate transgene-specific immune response. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 1990-1998.
- Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *Journal of virology* 76, 791-801.
- Rabinowitz, J.E., and Samulski, J. (1998). Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. *Current opinion in biotechnology* 9, 470-475.
- Reh, T.A. (2006). Neurobiology: right timing for retina repair. *Nature* 444, 156-157.
- Ripps, H. (2002). Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Experimental eye research* 74, 327-336.
- Rossmiller, B., Mao, H., and Lewin, A.S. (2012). Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular vision* 18, 2479-2496.

- Sahaboglu, A., Paquet-Durand, O., Dietter, J., Dengler, K., Bernhard-Kurz, S., Ekstrom, P.A., Hitzmann, B., Ueffing, M., and Paquet-Durand, F. (2013). Retinitis pigmentosa: rapid neurodegeneration is governed by slow cell death mechanisms. *Cell death & disease* 4, e488.
- Sahel, J., Bonnel, S., Mrejen, S., and Paques, M. (2010). Retinitis pigmentosa and other dystrophies. *Developments in ophthalmology* 47, 160-167.
- Sandberg, M.A., Weigel-DiFranco, C., Rosner, B., and Berson, E.L. (1996). The relationship between visual field size and electroretinogram amplitude in retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 37, 1693-1698.
- Sanlioglu, S., Benson, P.K., Yang, J., Atkinson, E.M., Reynolds, T., and Engelhardt, J.F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *Journal of virology* 74, 9184-9196.
- Santos, A., Humayun, M.S., de Juan, E., Jr., Greenburg, R.J., Marsh, M.J., Klock, I.B., and Milam, A.H. (1997). Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. *Archives of ophthalmology* 115, 511-515.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F., and Biel, M. (1998). An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4696-4701.
- Schambach, A., Galla, M., Maetzig, T., Loew, R., and Baum, C. (2007). Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 1167-1173.
- Schlichtenbrede, F.C., MacNeil, A., Bainbridge, J.W., Tschernutter, M., Thrasher, A.J., Smith, A.J., and Ali, R.R. (2003). Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration. *Gene therapy* 10, 523-527.
- Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., and Chiorini, J.A. (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *Journal of virology* 82, 1399-1406.
- Schuster, A., Weisschuh, N., Jagle, H., Besch, D., Janecke, A.R., Zierler, H., Tippmann, S., Zrenner, E., and Wissinger, B. (2005). Novel rhodopsin mutations and genotype-phenotype correlation in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *The British journal of ophthalmology* 89, 1258-1264.
- Seeliger, M.W., Beck, S.C., Pereyra-Munoz, N., Dangel, S., Tsai, J.Y., Luhmann, U.F., van de Pavert, S.A., Wijnholds, J., Samardzija, M., Wenzel, A., *et al.* (2005). In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision research* 45, 3512-3519.
- Seeliger, M.W., Grimm, C., Stahlberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Guo, H., Reme, C.E., Humphries, P., Hofmann, F., *et al.* (2001a). New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nature genetics* 29, 70-74.
- Seeliger, M.W., Jurklies, B., Kellner, U., Palmowski, A., Bach, M., and Kretschmann, U. (2001b). [Multifocal electroretinography (mfERG)]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 98, 1112-1127; quiz 1128-1119.
- Seiler, M.P., Miller, A.D., Zabner, J., and Halbert, C.L. (2006). Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Human gene therapy* 17, 10-19.
- Sieving, P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J., Fullmer, K.R., and Bush, R.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration:

- phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3896-3901.
- Simpson, D.A., Clark, G.R., Alexander, S., Silvestri, G., and Willoughby, C.E. (2011). Molecular diagnosis for heterogeneous genetic diseases with targeted high-throughput DNA sequencing applied to retinitis pigmentosa. *Journal of medical genetics* 48, 145-151.
- Singh, M.S., Charbel Issa, P., Butler, R., Martin, C., Lipinski, D.M., Sekaran, S., Barnard, A.R., and MacLaren, R.E. (2013). Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1101-1106.
- Singh, M.S., and MacLaren, R.E. (2011). Stem cells as a therapeutic tool for the blind: biology and future prospects. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 278, 3009-3016.
- Smith, A.J., Bainbridge, J.W., and Ali, R.R. (2012). Gene supplementation therapy for recessive forms of inherited retinal dystrophies. *Gene therapy* 19, 154-161.
- Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R., and Kleinschmidt, J.A. (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *Journal of virology* 80, 11040-11054.
- Stingl, K., Bartz-Schmidt, K.U., Besch, D., Braun, A., Bruckmann, A., Gekeler, F., Greppmaier, U., Hipp, S., Hortdorfer, G., Kernstock, C., *et al.* (2013). Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 280, 20130077.
- Stone, J.L., Barlow, W.E., Humayun, M.S., de Juan, E., Jr., and Milam, A.H. (1992). Morphometric analysis of macular photoreceptors and ganglion cells in retinas with retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology* 110, 1634-1639.
- Summerford, C., Bartlett, J.S., and Samulski, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature medicine* 5, 78-82.
- Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of virology* 72, 1438-1445.
- Sun, J.Y., Anand-Jawa, V., Chatterjee, S., and Wong, K.K. (2003). Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene therapy* 10, 964-976.
- Surace, E.M., and Auricchio, A. (2003). Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer. *Progress in retinal and eye research* 22, 705-719.
- Takeda, S., Takahashi, M., Mizukami, H., Kobayashi, E., Takeuchi, K., Hakamata, Y., Kaneko, T., Yamamoto, H., Ito, C., Ozawa, K., *et al.* (2004). Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors in vitro and in vivo. *Nephron Experimental nephrology* 96, e119-126.
- Tanaka, J., Markerink-van Ittersum, M., Steinbusch, H.W., and De Vente, J. (1997). Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain. *Glia* 19, 286-297.
- Tanimoto, N., Muehlfriedel, R.L., Fischer, M.D., Fahl, E., Humphries, P., Biel, M., and Seeliger, M.W. (2009). Vision tests in the mouse: Functional phenotyping with electroretinography. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14, 2730-2737.
- Taymans, J.M., Vandenberghe, L.H., Haute, C.V., Thiry, I., Deroose, C.M., Mortelmans, L., Wilson, J.M., Debyser, Z., and Baekelandt, V. (2007). Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human gene therapy* 18, 195-206.

- Tratschin, J.D., West, M.H., Sandbank, T., and Carter, B.J. (1984). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol* 4, 2072-2081.
- Trifunovic, D., Dengler, K., Michalakakis, S., Zrenner, E., Wissinger, B., and Paquet-Durand, F. (2010). cGMP-dependent cone photoreceptor degeneration in the *cpfl1* mouse retina. *The Journal of comparative neurology* 518, 3604-3617.
- Vandenberghe, L.H., and Auricchio, A. (2012). Novel adeno-associated viral vectors for retinal gene therapy. *Gene Ther* 19, 162-168.
- Vandenberghe, L.H., Bell, P., Maguire, A.M., Cearley, C.N., Xiao, R., Calcedo, R., Wang, L., Castle, M.J., Maguire, A.C., Grant, R., *et al.* (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Science translational medicine* 3, 88ra54.
- Vandenberghe, L.H., Bell, P., Maguire, A.M., Xiao, R., Hopkins, T.B., Grant, R., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2013). AAV9 Targets Cone Photoreceptors in the Nonhuman Primate Retina. *PLoS one* 8, e53463.
- Wang, C., Wang, C.M., Clark, K.R., and Sferra, T.J. (2003). Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene therapy* 10, 1528-1534.
- Wang, S.Z. (2009). Tales of retinogenesis told by human stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16543-16544.
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J., and Xiao, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature biotechnology* 23, 321-328.
- Wassle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature reviews Neuroscience* 5, 747-757.
- Watanabe, S., Sanuki, R., Ueno, S., Koyasu, T., Hasegawa, T., and Furukawa, T. (2013). Tropisms of AAV for subretinal delivery to the neonatal mouse retina and its application for in vivo rescue of developmental photoreceptor disorders. *PLoS one* 8, e54146.
- Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Cherel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P., *et al.* (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 7, 774-781.
- Weinstein, R. (1999). Phytanic acid storage disease (Refsum's disease): clinical characteristics, pathophysiology and the role of therapeutic apheresis in its management. *Journal of clinical apheresis* 14, 181-184.
- Weitz, D., Ficek, N., Kremmer, E., Bauer, P.J., and Kaupp, U.B. (2002). Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* 36, 881-889.
- Wen, R., Tao, W., Li, Y., and Sieving, P.A. (2012). CNTF and retina. *Progress in retinal and eye research* 31, 136-151.
- Wert, K.J., Davis, R.J., Sancho-Pelluz, J., Nishina, P.M., and Tsang, S.H. (2012). Gene therapy provides long-term visual function in a pre-clinical model of retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics*.
- Wu, C., and Lu, Y. (2007). Inclusion of high molecular weight dextran in calcium phosphate-mediated transfection significantly improves gene transfer efficiency. *Cellular and molecular biology* 53, 67-74.
- Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 316-327.
- Wu, Z.J., Yang, H.Y., and Colosi, P. (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy* 18, 80-86.

- Yang, G.S., Schmidt, M., Yan, Z., Lindbloom, J.D., Harding, T.C., Donahue, B.A., Engelhardt, J.F., Kotin, R., and Davidson, B.L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *Journal of virology* 76, 7651-7660.
- Zhang, F., Wang, L.P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., *et al.* (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639.
- Zhang, T., Baehr, W., and Fu, Y. (2012). Chemical chaperone TUDCA preserves cone photoreceptors in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 3349-3356.
- Zhang, Y., Ivanova, E., Bi, A., and Pan, Z.H. (2009). Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 9186-9196.
- Zheng, J., Trudeau, M.C., and Zagotta, W.N. (2002). Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36, 891-896.
- Zhong, H., Molday, L.L., Molday, R.S., and Yau, K.W. (2002). The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature* 420, 193-198.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., Koch, W.J., and Rabinowitz, J.E. (2010). Comparative cardiac gene delivery of adeno-associated virus serotypes 1-9 reveals that AAV6 mediates the most efficient transduction in mouse heart. *Clinical and translational science* 3, 81-89.
- Zobor, D., and Zrenner, E. (2012). [Retinitis pigmentosa - a review. Pathogenesis, guidelines for diagnostics and perspectives]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 109, 501-514;quiz 515.
- Zrenner, E. (2002). Will retinal implants restore vision? *Science* 295, 1022-1025.
- Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K.U., Benav, H., Besch, D., Bruckmann, A., Gabel, V.P., Gekeler, F., Greppmaier, U., Harscher, A., Kibbel, S., *et al.* (2011). Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 278, 1489-1497.
- Zrenner, E., Miliczek, K.D., Gabel, V.P., Graf, H.G., Guenther, E., Haemmerle, H., Hoefflinger, B., Kohler, K., Nisch, W., Schubert, M., *et al.* (1997). The development of subretinal microphotodiodes for replacement of degenerated photoreceptors. *Ophthalmic research* 29, 269-280.

## VIII Anhang

### 1 Abkürzungen

|       |  |
|-------|--|
| AAV   | adeno-assoziierte Viren  |
| ANOVA | Varianzanalyse (analysis of variance)                              |
| bp    | Basenpaare   |
| cAMP  | zyklisches Adenosinmonophosphat                                    |
| Cap   | Kapsid   |
| cDNA  | komplementäre Desoxyribonucleinsäure                               |
| cGMP  | zyklisches Guanosinmonophosphat                                    |
| CNBD  | Zyklonukleotidbindungsstelle (cyclic nucleotide-binding domain)    |
| CNG   | zyklonukleotid-aktiviert (cyclic nucleotide-gated)                 |
| DMEM  | Dulbecco's modified eagle medium                                   |
| dNTPs | Desoxyribonucleotide   |
| ERG   | Elektroretinogramm   |
| FBS   | fetales Kälberserum (fetal bovine serum)                           |
| GCL   | Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)                          |
| GFAP  | Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)                 |
| HEK   | menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells) |
| INL   | innere Körnerschicht (inner nuclear layer)                         |
| IPL   | innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)                  |
| iPS   | induzierte pluripotente Stammzellen                                |
| IS    | Innensegment (inner segment)                                       |
| ITRs  | inverted terminal repeats  |
| kD    | Kilodalton   |
| OCT   | optische Kohärenztomografie (optical coherence tomography)         |
| ONL   | äußere Körnerschicht (outer nuclear layer)                         |
| OPL   | äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)                  |
| ORI   | Replikationsursprung (origin of replication)                       |
| OS    | Außensegment (outer segment)                                       |
| PB    | Phosphatpuffer   |
| PCR   | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)               |



|       |  |
|-------|--|
| PDE   | Phosphodiesterase  |
| PFA   | Paraformaldehyd  |
| qPCR  | quantitative Polymerasekettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction) |
| rAAV  | rekombinante adeno-assoziierte Viren   |
| Rep   | Replikation  |
| Rho   | Rhodopsin  |
| RPE   | retinales Pigmentepithel   |
| rpm   | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)                                |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)                                   |
| SV40  | Simian Virus 40  |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin   |
| TRIS  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |

## 2 Publikationen

- Michalakis S, Schäferhoff K, Spiwoks-Becker I, Zabouri N, **Koch S**, Koch F, Michael Bonin M, Biel M, Haverkamp S (2012): Characterization of neurite outgrowth and ectopic synaptogenesis in response to photoreceptor dysfunction. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Dec 27. [Epub ahead of print]
- Brandmayr C, Wagner M, Brückl T, Globisch D, Pearson D, Kneuttinger A, Reiter V, **Koch S**, Hienzsch A, Thoma I, Thumbs P, Michalakis S, Müller M, Biel M, Carell T (2012): Isotope based analysis of modified tRNA nucleosides correlates modification density with translational efficiency. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51(44):11162-5
- Koch S**, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Tanimoto N, Becirovic E, Koch F, Seide C, Beck SC, Seeliger MW, Biel M, Mühlfriedel R, Michalakis S, (2012): Gene therapy restores vision and delays degeneration in the CNGB1<sup>-/-</sup> mouse model of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 21(20):4486-96
- Michalakis S, Mühlfriedel R, Tanimoto N, Krishnamoorthy V, **Koch S**, Fischer MD, Becirovic E, Bai L, Huber G, Beck SC, Fahl E, Büning H, Schmidt J, Zong X, Gollisch T, Biel M, Seeliger MW (2012): Gene therapy restores missing cone-mediated vision in the CNGA3<sup>-/-</sup> mouse model of achromatopsia. *Adv Exp Med Biol.* 723:183-9
- Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakis S, Wagner M, **Koch S**, Brückl T, Biel M, Carell T (2010): Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* 5(12):e15367
- Michalakis S, Mühlfriedel R, Tanimoto N, Krishnamoorthy V, **Koch S**, Fischer MD, Becirovic E, Bai L, Huber G, Beck SC, Fahl E, Büning H, Paquet-Durand F, Zong X, Gollisch T, Biel M, Seeliger MW (2010): Restoration of cone vision in the CNGA3<sup>-/-</sup> mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Mol Ther* 18(12):2057-63
- Michalakis S, Kleppisch T, Polta SA, Wotjak CT, **Koch S**, Rammes G, Matt L, Becirovic E, Biel M (2010): Altered synaptic plasticity and behavioral abnormalities in CNGA3-deficient mice. *Genes Brain Behav.* 10(2):137-48

### 3      **Lebenslauf**

#### Persönliche Daten

---

|               |              |
|---------------|--------------|
| Name          | Susanne Koch |
| Geburtsdatum  | 03.10.1985   |
| Geburtsort    | Bamberg      |
| Familienstand | ledig        |

#### Ausbildung

---

|                      |   |
|----------------------|---|
| Nov 2009 –Feb 2013   | Doktorandin im Labor von Prof. Martin Biel<br>Pharmakologie für Naturwissenschaften<br>Ludwig-Maximilians-Universität München |
| Sept 2008 –Juni 2009 | Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen  |
| Okt 2004 –Juli 2008  | Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen   |
| Sept 1995 –Juni 2004 | Kaiser-Heinrich-Gymnasium in Bamberg  |
| Sept 1991 –Juni 1995 | Grundschule Altenburgblick in Stegaurach  |

#### Konferenzen und Workshops

---

|           |  |
|-----------|--|
| März 2012 | 18 <sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy in Frankfurt:<br>Vortrag (Reisestipendium von 500€)   |
| März 2012 | 78 <sup>th</sup> Annual Meeting of the DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie) in Dresden:<br>Poster (Nominierung für den Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology Posterpreis) |
| Sept 2011 | Workshop "Gene Therapy" in Köln:<br>Vortrag  |
| Mai 2011  | Workshop "How to study Cell Death Mechanisms in the retina" in Tübingen  |

## **4 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Biel herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die stets kompetente Unterstützung.

Herrn PD Dr. Stylianos Michalakakis danke ich für die hervorragende Betreuung. Lieber Stelios, du warst der beste Betreuer, den ich mir wünschen konnte. Ich habe unglaublich viel von dir gelernt.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Seeliger (Universität Tübingen), besonders Dr. Regine Mühlfriedel, Vithiyanjali Sothilingam, Marina Garcia Garrido und Dr. Naoyuki Tanimoto, danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit.

Elvir, du warst mir eine riesige Hilfe in den letzten Jahren. Du weißt es zwar schon, aber ich gebe es dir gern nochmal schriftlich: Du bist großartig!

Ich bin immer sehr gern zur Arbeit gegangen, und das liegt zum großen Teil daran, dass ich so nette Kollegen hatte. Vielen Dank an euch alle, besonders an Anke, Berit, Christian, Christos, Fredl, Katrin, Lior, Phuong, Prakti, Sami, Steffi und Verena. Ab jetzt werden wir zwar nicht mehr zusammen arbeiten, aber hoffentlich noch ab und zu zusammen den „guteen“ Rosé trinken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie – danke, dass ihr für mich da seid.